

# **Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Ambruticin VS-3**

Der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte

Dissertation

von  
Peter Knauth  
aus Kiel

von Peter Knauth  
aus Kiel

1. Referent: Prof. Dr. Hans Reichenbach

2. Referent: Prof. Dr. Thomas Hartmann

eingereicht am: 18.11.1999

mündliche Prüfung (Disputation) am: 3.3.2000

## **Danksagung**

Besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Hans Reichenbach für die Bereitstellung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung als Erstgutachter und die anregenden Diskussionen bedanken.

Ferner möchte ich Prof. Dr. Hartmann, als Gutachter zu fungieren, danken.

Dr. Florenz Sasse und Dr. Klaus Gerth danke ich für die stets tatkräftige Unterstützung und die wertvollen Tips für die Laborarbeit,

wie auch der Arbeitsgruppe Naturstoffbiologie im allgemeinen und dem Labor D1.02 im besonderen für die gute und anregende Zusammenarbeit, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Des weiteren bedanke ich mich bei

Prof. Dr. Gerhard Höfle für Bereitstellung der Ambruticine und die Tips zur Methylierung von Ambruticin VS-4 und bei

Dr. Heinrich Lünsdorf und Frau Elke Haase für die Transmissionselektroskopieaufnahmen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Hans Diethard Knauth für die Finanzierung meines Studiums, die konstruktive Kritik bei meiner Dissertation und die moralische Unterstützung.

## Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	IV
Inhaltsverzeichnis .....	IV
Abkürzungsverzeichnis .....	VIII
Abbildungsverzeichnis .....	X
Tabellenverzeichnis .....	XIV
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Myxobakterien .....	1
1.2 Antibiotika .....	1
1.2.1 Definition .....	1
1.2.2 Wirkmechanismus .....	2
1.2.3 Fungizide .....	2
1.3 Ambruticin .....	4
1.3.1 Produktion und Isolierung .....	5
1.3.2 Chemische Eigenschaften von Ambruticin .....	5
1.3.3 Bisherige Untersuchungen .....	6
1.4 Ziel dieser Arbeit .....	8
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>10</b>
2.1 Geräte und Chemikalien .....	10
2.2 Lösungen und Puffer .....	10
2.3 Stammhaltung und Kultivierung .....	11
2.3.1 Medien .....	11
2.3.2 Stammhaltung .....	12
2.3.3 Kultivierung .....	12
2.4 Minimale Hemmkonzentration (MHK) .....	13
2.4.1 Absterbekurve .....	13
2.4.2 pH-Wert .....	13
2.4.3 Antagonisten .....	13
2.4.4 Aerobe/anaerobe Kultivierung .....	14
2.4.5 Adsorption von Ambruticin an Zellen, Zellextrakten und Seren .....	15
2.4.6 Protoplasten .....	16
2.4.7 Liposomen .....	17
2.4.8 Permeabilisierte Zellen .....	18
2.4.9 Stoffwechselaktivität .....	18
2.5 Kreuzresistenz .....	19
2.6 Energieladung .....	20
2.6.1 Adenylat-Bestimmung .....	20



2.7	DNA als Informationsmatrix .....	21
2.7.1	Wechselwirkung mit DNA .....	21
2.7.2	DNA-Strangbrüche .....	21
2.8	Vorversuche zur Synthese von $^{14}\text{C}$ -Ambruticin .....	22
2.8.1	Unterschiedliche Konzentrationsverhältnisse.....	23
2.8.2	Unterschiedliche Reaktionszeit.....	24
2.8.3	Unterschiedliche Lösungsmittel .....	24
2.8.4	Unterschiedliche Konzentrationsverhältnisse II .....	24
2.8.5	Nachweis der Ambruticine .....	25
2.8.6	Toxizitätstest.....	25
2.9	Biosynthesen mit $^{14}\text{C}$ -Präkursoren.....	26
2.9.1	DNA-Synthese mit $^{14}\text{C}$ -Adenin .....	27
2.9.2	Nucleinsäuresynthese mit $^{14}\text{C}$ -Adenin.....	27
2.9.3	RNA-Synthese mit $^{14}\text{C}$ -Uracil .....	27
2.9.4	Proteinsynthese mit $^{14}\text{C}$ -Leucin .....	27
2.9.5	Lipidsynthese mit $^{14}\text{C}$ -Acetat.....	27
2.9.6	Polymersynthesen mit $^{14}\text{C}$ -Glycerin .....	28
2.9.7	Lipidsynthese mit $^3\text{H}$ -Inosit.....	28
2.9.8	Einfluß auf Synthesen mit 3- $^{14}\text{C}$ -Pyruvat .....	28
2.9.9	Polymersynthese und $\text{CO}_2$ -Freisetzung aus U- $^{14}\text{C}$ -Glucose.....	28
2.9.10	Zellwandsynthese und Glycoproteine mit $^{14}\text{C}$ -Mannose .....	28
2.9.11	Zellteilung mit $^{14}\text{C}$ -N-Acetylglucosamin.....	29
2.9.12	Zellpermeabilität mit $^{14}\text{C}$ -Isoaminobutyrat.....	29
2.10	Glycerin.....	29
2.10.1	Glycerin-Bestimmung mittels HPLC.....	29
2.10.2	Enzymatische Glycerin-Bestimmung .....	31
2.10.3	Glycerin-Nachweis mit $^{14}\text{C}$ -Glucose .....	33
2.11	Lipidmuster.....	34
2.11.1	Charakterisierung des Lipidextraktes .....	35
2.11.2	Charakterisierung der Lipide $R_f$ 0,45 und $R_f$ 0,83 .....	36
2.11.3	Untersuchung der Steroidsynthese.....	36
2.12	Untersuchungen zur Reversibilität des Ambruticineffektes .....	37
2.12.1	Mediumwechsel.....	37
2.12.2	XAD-Zugabe.....	37
2.12.3	XAD und Lipid-Extraktion.....	37
2.13	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) .....	38

<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>39</b>
3.1	Minimale Hemmkonzentration (MHK).....	39
3.1.1	Absterbekurve .....	40
3.1.2	pH-Wert.....	41
3.1.3	Antagonisten.....	41
3.1.4	Aerobe/anaerobe Kultivierung .....	43
3.1.5	Adsorption von Ambruticin an Zellen, Zellextrakten und Seren .....	45
3.1.6	Protoplasten .....	48
3.1.7	Liposomen .....	48
3.1.8	Permeabilisierung.....	49
3.1.9	Stoffwechselaktivität .....	50
3.2	Kreuzresistenz .....	51
3.3	Energieladung.....	53
3.4	DNA als Informationsmatrix.....	54
3.4.1	Wechselwirkung mit DNA.....	54
3.4.2	DNA-Strangbrüche.....	55
3.5	Vorversuche zur Synthese von $^{14}\text{C}$ -Ambruticin.....	56
3.5.1	Unterschiedliche Konzentrationsverhältnisse .....	56
3.5.2	Unterschiedliche Reaktionszeit .....	57
3.5.3	Unterschiedliche Lösungsmittel .....	57
3.5.4	Unterschiedliche Konzentrationen II.....	58
3.5.5	Toxizitätstest .....	58
3.5.6	Ansatz zur Synthese von $^{14}\text{C}$ -Ambruticin .....	59
3.6	Biosynthesen mit $^{14}\text{C}$ -Präkursoren .....	59
3.6.1	DNA-Synthese mit $^{14}\text{C}$ -Adenin.....	59
3.6.2	Nucleinsäuresynthese mit $^{14}\text{C}$ -Adenin .....	60
3.6.3	RNA-Synthese mit $^{14}\text{C}$ -Uracil.....	61
3.6.4	Proteinsynthese mit $^{14}\text{C}$ -Leucin.....	61
3.6.5	Lipidsynthese mit $^{14}\text{C}$ -Acetat .....	62
3.6.6	Polymersynthese mit $^{14}\text{C}$ -Glycerin.....	64
3.6.7	Synthese der Phospholipide und Sphingolipide mit $^3\text{H}$ -Inosit .....	65
3.6.8	Polymersynthese aus $^{14}\text{C}$ -Pyruvat .....	66
3.6.9	Polymersynthese und $\text{CO}_2$ -Freisetzung aus U- $^{14}\text{C}$ -Glucose .....	67
3.6.10	Zellwandsynthese und Glycoproteine mit $^{14}\text{C}$ -Mannose.....	68
3.6.11	Zellteilung mit $^{14}\text{C}$ -N-Acetylglucosamin .....	68
3.6.12	Zellpermeabilität mit $^{14}\text{C}$ -Isoaminobutyrat .....	69
3.6.13	Fazit .....	70

3.7	Glycerin.....	70
3.7.1	Glycerin-Bestimmung mittels HPLC.....	70
3.7.2	Enzymatische Glycerin-Bestimmung .....	71
3.7.3	Glycerin-Nachweis mit $^{14}\text{C}$ -Glucose .....	72
3.8	Lipidmuster.....	75
3.8.1	Lipidmuster von <i>H. anomala</i> .....	75
3.8.2	Lipidmuster bei <i>H. anomala</i> R <sup>Amb</sup> .....	78
3.8.3	Charakterisierung des Lipidextraktes .....	79
3.8.4	Charakterisierung der Lipide R <sub>f</sub> 0,45 und R <sub>f</sub> 0,83 .....	80
3.8.5	Steroidsynthese .....	81
3.9	Untersuchungen zur Reversibilität des Ambruticineffektes .....	82
3.9.1	Mediumwechsel.....	82
3.9.2	XAD-Zugabe.....	83
3.9.3	XAD und Lipid-Extraktion.....	84
3.10	Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) .....	86
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>88</b>
4.1	Voruntersuchungen.....	88
4.2	Katabolismus .....	89
4.3	Anabolismus .....	90
4.4	Resistenz .....	91
4.5	Weitere Untersuchungen.....	92
4.6	Glycerin.....	92
4.6.1	Regulation der Glycerinsynthese bei Hefen .....	92
4.7	Veränderungen im Lipidmuster .....	97
4.8	Ausblick .....	98
4.8.1	Arbeiten mit $^{14}\text{C}$ -Ambruticin.....	98
4.8.2	Chromatographische Anreicherung .....	98
4.8.3	Affinitätschromatographie .....	99
4.8.4	Gelelektrophorese .....	99
4.8.5	Charakterisierung und Sequenzierung .....	99
4.8.6	Genetik.....	99
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>101</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>103</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	vollentsalztes Wasser
Ac	Acetat
AIDS	acquired immunodeficiency syndrome
Amb	Ambruticin VS-3
Ambruticin	Ambruticin VS-3
bp	Basenpaar(e)
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CoA	Coenzym A
cpm	counts per minute (Impulse pro Minute)
DC	Dünnschichtchromatographie
DBED	N,N'-Dibenzylethylendiamindiacetat
DEAE	Diethylaminoethyl
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DME	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	D,L-Dithiothreitol
EBS	Earle's Buffered Salts
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavinadenindinucleotid
FNM	oxidiertes Flavinmononucleotid
<i>g</i>	Fallbeschleunigung ( $\approx 9,81 \text{ m/s}^2$ )
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HOG	High Osmolarity Glycerol Response
HPLC	High-Pressure-Liquid-Chromatography
KBE	Koloniebildende Einheit
Konz.	Konzentration
LD <sub>50</sub>	Letale Dosis, bei der 50 % der Testorganismen gestorben sind
MES	2-N-Morpholinoethansulfonsäure
M <sub>G</sub>	Molekulargewicht [g/mol = Da]
MHK	Minimale Hemmkonzentration
mRNA	messenger RNA
NAD(H)	oxidiertes (reduziertes) Flavinadenindinucleotid
NADP(H)	oxidiertes (reduziertes) Flavinadenindinucleotidphosphat
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte, gemessen bei der Wellenlänge x
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAss	Phosphatidsäure-distearyl

PCss	Phosphatidylcholin-distearyl
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEss	Phosphatidylethanolamin-distearyl
PGss	Phosphatidylglycerin-distearyl
PIPES	Piperazin-N,N'-bis-2-ethansulfonsäure
PMSF	Phenylmethylsulfonsäurefluorid
R <sub>f</sub>	Retardierungskoeffizient
RNA	Ribonucleinsäure
R <sub>t</sub>	Retentionszeit
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
S <sub>p</sub>	Schmelzpunkt [°C]
TCA	Trichloressigsäure
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer RNA
U/min	Umdrehungen pro Minute
WST-1	4-[3-(4-Jodphenyl)-2-(4-nitro-phenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzol-disulfonat
ATP/ADP/AMP	Adenosin-tri/di/mono-phosphat
UTP/UDP/UMP	Uridin-tri/di/mono-phosphat
CTP/GTP	Cytidin/Guanosin-triphosphat
Ade/Cyt/Gua/Thy/Ura	Adenin/Cytosin/Guanin/Thymin/Uracil
dAdo/dCyd/dGuo/dThd	Desoxy-adenosin/cytidin/guanosin/thymidin
dAMP/dCMP/dGMP/dTMP/dUMP	Desoxy-adenosin/cytidin/guanosin/thymidin/uridin-monophosphat

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strukturformeln und Molgewichte der Ambruticine S bzw. VS.....	4
Abb. 2: Synthesebausteine für Ambruticin VS-1 .....	5
Abb. 3: Infrarot-Spektrum von Ambruticin VS-3 .....	6
Abb. 4: Chemische Strukturformeln von Jerangolid A und Pyrrolnitrin .....	7
Abb. 5: Nachweis-Schema zur Adenylat-Bestimmung.....	20
Abb. 6: Reaktionsschema zur Methylierung von Ambruticin VS-4 zu Ambruticin VS-1 und VS-3.....	23
Abb. 7: Trennung verschiedener Zucker mittels HPLC (refraktometrische Detektion) .....	30
Abb. 8: Kalibrierungskurve zur Glucose und Glycerin-Bestimmung mittels HPLC.....	30
Abb. 9: Kalibrierungskurve zur enzymatischen Glycerin-Bestimmung .....	32
Abb. 10: Retentionszeiten von <sup>14</sup> C-markierten und unmarkierten Standards .....	33
Abb. 11: Einfluß der Inokulumgröße von <i>H. anomala</i> auf die MHK von Ambruticin.....	39
Abb. 12: Ambruticin-Zugabe zu frischen Kulturen von <i>H. anomala</i> nach 0, 2, 4 bzw. 6 h, so daß sich die Zellen zum Zeitpunkt der Zugabe in unterschiedlichen Wachstumsphasen befanden .....	40
Abb. 13: Effekt von Ambruticin auf die Vermehrungsfähigkeit von <i>H. anomala</i> in Medium bei 30 °C mit 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml, 1,0 µg/ml und 1,0 µg/ml bei 0 °C.....	40
Abb. 14: Effekt von Pyrrolnitrin auf die Vermehrungsfähigkeit von <i>H. anomala</i> mit 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml und 1,0 µg/ml .....	41
Abb. 15: Auswirkung unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen auf die MHK von <i>H. anomala</i> von Ambruticin bzw. Pyrrolnitrin: aerob, anaerob.....	43
Abb. 16: Einfluß verschiedener Verdünnungen von 2,4-Dinitrophenol auf das Wachstum von <i>H. anomala</i> sowie die MHK von Ambruticin bzw. Pyrrolnitrin mit 2,4-Dinitrophenol bei 1:80-Verdünnung.....	44
Abb. 17: Auswirkung unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen von <i>H. anomala</i> R <sup>Amb</sup> auf die MHK von Ambruticin bzw. Pyrrolnitrin: aerob bzw. anaerob.....	44
Abb. 18: Bestimmung der MHK im Medium (Minimalmedium bzw. A. dest.), das zuvor mit 10 <sup>7</sup> Zellen/ml für 30 min behandelt wurde: Vorbehandlung mit <i>H. anomala</i> in Minimalmedium bzw. A. dest. sowie mit <i>H. anomala</i> R <sup>Amb</sup> in Minimalmedium bzw. A. dest. ...	45
Abb. 19: Keine Änderung der MHK für <i>H. anomala</i> durch Zugabe von <i>H. anomala</i> R <sup>Amb</sup> -Zellextrakt pur bzw. supplementiert mit ATP/GTP, NAD(P) <sup>+</sup> , NAD(P)H + H <sup>+</sup> , FAD/FMN .....	46
Abb. 20: Erhöhung der MHK durch Erhöhung des zugegebenen Kaninchen-Serums zum Medium: 1 %, 5 %, 10 %, 20 % .....	46
Abb. 21: MHK-Bestimmung nach Zugabe von 10 % ultrafiltriertem Kaninchen-Serum (Ausschlußgröße 100.000 [Da]): Filtrat, Überstand und Kontrolle ohne Serum .....	47

Abb. 22: MHK-Bestimmung nach Zugabe von 10% vorbehandeltem Kaninchen-Serum: TCA-Fällung, erhitzen auf 95 °C und Kontrollen .....	47
Abb. 23: MHK nach Permeabilisierung von <i>H. anomala</i> (sensitiv/resistent), mit Lyticase, CHCl <sub>3</sub> /SDS oder Toluol.....	50
Abb. 24: Stoffwechselaktivität von <i>H. anomala</i> gemessen als WST-1-Färbung (ΔOD <sub>450</sub> ) mit 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml, 1,0 µg/ml Ambruticin und 0,5 µg/ml Pyrrolnitrin.....	50
Abb. 25: Untersuchung auf Synergismus. Die MHK für Ambruticin und für Pyrrolnitrin. In Kombination wirkten Ambruticin und Pyrrolnitrin synergistisch .....	51
Abb. 26: Untersuchung auf Synergismus. Die MHK für Ambruticin und für Jerangolid. In Kombination wirkten Ambruticin und Jerangolid synergistisch .....	52
Abb. 27: Veränderung der intrazellulären ATP, ADP und AMP-Konzentration sowie der Energieladung (AEC) bei <i>H. anomala</i> nach Zugabe von 0,1 µg/ml Ambruticin .....	54
Abb. 28: Vergleich der gemessenen UV-Spektren von DNA mit Ambruticin bzw. Ethidiumbromid mit den berechneten Spektren aus DNA und Ambruticin bzw. Ethidiumbromid.....	55
Abb. 29: Auftrennung der Chromosomen von <i>H. anomala</i> mittels Wechselfeld-Gelelektrophorese nach unterschiedlicher Behandlung.....	56
Abb. 30: DC-Lauf von umgesetztem Ambruticin VS-4 mit 4-, 8- und 16fachem CH <sub>3</sub> J-Überschuß und Reaktionszeiten von 1 bzw. 3 h (Lösungsmittel: Ethanol).....	57
Abb. 31: DC-Lauf von umgesetztem Ambruticin VS-4 nach 1, 3, 6, 24 und 48 h Reaktionszeit bei 2,9fachem CH <sub>3</sub> J-Überschuß (Lösungsmittel: Ethanol).....	57
Abb. 32: DC-Lauf von umgesetztem Ambruticin VS-4 mit Methanol oder Isopropanol als Lösungsmittel nach 6 bzw. 24 h Reaktionszeit bei 2,9fachem CH <sub>3</sub> J-Überschuß.....	58
Abb. 33: DC-Lauf von umgesetztem Ambruticin VS-4 mit einem 2 : 1; 1 : 1 und 1 : 2-Verhältnis CH <sub>3</sub> J/Ambruticin nach 24 h Reaktionszeit und Isopropanol als Lösungsmittel.....	58
Abb. 34: Einfluß von 1,0 µg/ml Ambruticin auf die DNA-Synthese bei <i>H. anomala</i> .....	60
Abb. 35: Einfluß von 1,0 µg/ml Ambruticin auf die Nucleinsäuresynthese bei <i>H. anomala</i> .....	60
Abb. 36: Einfluß von 1,0 µg/ml Ambruticin auf die RNA-Synthese bei <i>H. anomala</i> .....	61
Abb. 37: Einfluß von 1,0 µg/ml Ambruticin bzw. Cycloheximid auf die Proteinsynthese bei <i>H. anomala</i> .....	62
Abb. 38: Einfluß von 1,0 µg/ml Ambruticin auf die Lipidsynthese bei <i>H. anomala</i> .....	62
Abb. 39: Lipidsynthese nach Zugabe von 0,1 µg/ml Ambruticin zur Kultur von <i>H. anomala</i> .....	63
Abb. 40: Bilanzierung des <sup>14</sup> C-Acetateinbaus in den einzelnen Fraktionen.....	64
Abb. 41: Polymersynthese von <i>H. anomala</i> mit <sup>14</sup> C-Glycerin nach Zugabe von 1,0 µg/ml Ambruticin .....	65
Abb. 42: <sup>3</sup> H-Inosit-Einbau (Phospholipide und Sphingolipide) nach Zugabe von 1,0 µg/ml Ambruticin .....	65
Abb. 43: <sup>3</sup> H-Inosit-Einbau differenziert in Sphingolipidsynthese und (berechnete) Phospholipidsynthese nach Zugabe von 1,0 µg/ml Ambruticin.....	66

Abb. 44: Polymersynthese mit $^{14}\text{C}$ -Pyruvat nach Zugabe von 1,0 $\mu\text{g/ml}$ Ambruticin.....	66
Abb. 45: Polymersynthese (vor allem Zellwandsynthese) mit $^{14}\text{C}$ -Glucose nach Zugabe von 1,0 $\mu\text{g/ml}$ Ambruticin.....	67
Abb. 46: $\text{CO}_2$ -Freisetzung aus $^{14}\text{C}$ -Glucose nach Zugabe von 0,05 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 1,0 $\mu\text{g/ml}$ Ambruticin.....	67
Abb. 47: Zellwandsynthese mit $^{14}\text{C}$ -Mannose nach Zugabe von 1,0 $\mu\text{g/ml}$ Ambruticin.....	68
Abb. 48: Zellteilung als Septumsynthese mit $^{14}\text{C}$ -N-Acetylglucosamin nach Zugabe von 1,0 $\mu\text{g/ml}$ Ambruticin.....	68
Abb. 49: Freisetzung von akkumuliertem $^{14}\text{C}$ -Isoaminobutyrat von <i>H. anomala</i> nach Zugabe von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Ambruticin, 1,0 $\mu\text{g/ml}$ in Puffer oder in Minimalmedium bei 0 °C. Resistenzmutante mit 10,0 $\mu\text{g/ml}$ und Positivkontrolle mit 30,0 $\mu\text{g/ml}$ Amphotericin B .	69
Abb. 50: Zellpermeabilität bei <i>H. anomala</i> mit $^{14}\text{C}$ -Isoaminobutyrat: Zugabe von 1,0 $\mu\text{g/ml}$ Ambruticin, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Pyrrolnitrin bzw. 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Pyrrolnitrin in Puffer .....	70
Abb. 51: Intrazelluläre Glycerinakkumulation bei <i>H. anomala</i> nach Zugabe von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Ambruticin und 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Pyrrolnitrin. Gemessen mittels HPLC.....	71
Abb. 52: Veränderung des Minimalmediums während der Kultivierung, die Werte sind wachstumskorrigiert: Glucose und Ethanol mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Ambruticin.....	71
Abb. 53: Intrazelluläre Glycerinakkumulation bei <i>H. anomala</i> nach Zugabe von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Ambruticin und 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Pyrrolnitrin. Enzymatische Messung .....	72
Abb. 54: HPLC-Läufe der $^{14}\text{C}$ -Glucose-markierten Zellextrakte von <i>H. anomala</i> , kultiviert in Glucose-freiem Casamino acid-Medium bzw. Glucose-reduziertem Minimalmedium ..	73
Abb. 55: Intrazelluläre $^{14}\text{C}$ -Glycerinakkumulation aus U- $^{14}\text{C}$ -Glucose bei <i>H. anomala</i> in Glucose-reduziertem Minimalmedium sowie in Glucose-freiem Casamino acid-Medium mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Ambruticin.....	74
Abb. 56: Glucoseaufnahme aus Minimalmedium sowie aus Glucose-freiem Casamino acid-Medium mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Ambruticin.....	75
Abb. 57: Mittels DC aufgetrennte, mit $^{14}\text{C}$ -Acetat-markierte Lipide von <i>H. anomala</i> nach Zugabe von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Ambruticin.....	76
Abb. 58: Akkumulation von $^{14}\text{C}$ -Acetat-markierten Triacylglyceriden und freien Fettsäuren bei <i>H. anomala</i> nach Zugabe von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Ambruticin.....	77
Abb. 59: Lipidmuster von <i>H. anomala</i> 4 h nach Zugabe von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Ambruticin bzw. Pyrrolnitrin .....	77
Abb. 60: Mittels DC aufgetrennte, mit $^{14}\text{C}$ -Acetat-markierte Lipide von <i>H. anomala</i> R <sup>Amb</sup> nach Zugabe von 1,0 $\mu\text{g/ml}$ Ambruticin .....	78
Abb. 61: $^{14}\text{C}$ -Acetat-markierter Lipidextrakt von <i>H. anomala</i> (3 h mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Ambruticin) acetyliert mit Trifluoracethanhydrid bzw. sauer umgeestert mit Methanol im Vergleich zum nicht umgesetzten Lipidextrakt .....	79
Abb. 62: Triacylglycerid-Peak ( $R_f$ 0,83) von <i>H. anomala</i> (3 h mit 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Ambruticin) sauer bzw. alkalisch umgeestert im Vergleich zum nicht umgesetzten Triacylglycerid..	80



Abb. 63: Peak der freien Fettsäuren ( $R_f$ 0,45) von <i>H. anomala</i> (3 h mit 0,1 µg/ml Ambruticin) sauer verestert im Vergleich zu nicht umgesetzten Fettsäuren.....	81
Abb. 64: $^{14}\text{C}$ -Mevalonsäure-markierter Lipidextrakt von <i>H. anomala</i> (4 h mit 0,1 µg/ml Ambruticin).....	82
Abb. 65: Vermehrungsfähigkeit (als KBE/ml) von <i>H. anomala</i> nach einem Mediumwechsel	83
Abb. 66: Vermehrungsfähigkeit von <i>H. anomala</i> mit 1,0 µg/ml Ambruticin nach Zugabe von 10% XAD-Suspension (v/v).....	83
Abb. 67: Langzeitwirkung von XAD-16 auf die Vermehrungsfähigkeit von <i>H. anomala</i> mit 1,0 µg/ml Ambruticin .....	84
Abb. 68: Vermehrungsfähigkeit von <i>H. anomala</i> mit 0,5 µg/ml Ambruticin nach Zugabe von 10% XAD-Suspension (v/v) im Versuch zur Extraktion $^{14}\text{C}$ -Acetat-markierter Lipide...	85
Abb. 69: Mittels DC aufgetrennter $^{14}\text{C}$ -Acetat-markierter Lipidextrakt aus mit XAD-16 regenerierten Zellen (Zellextrakt), die vorher für zwei Tage mit 0,5 µg/ml Ambruticin behandelt worden waren, sowie die am XAD adsorbierten Lipide (XAD-Extrakt).....	86
Abb. 70: TEM-Aufnahmen von <i>H. anomala</i> -Zellen, 1 min vor und 4 h nach Ambruticin-Zugabe.....	86
Abb. 71: HOG-Weg (High Osmolarity Glycerol Response) für <i>S. cerevisiae</i> .....	96
Abb. 72: Darstellung der zeitlichen Abfolge der einzelnen Effekte, die 0,1 µg/ml Ambruticin bei sensiblen Zellen von <i>H. anomala</i> bewirkt .....	102

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Vergleich einiger Eigenschaften der Ambruticine VS.....	6
Tab. 2: Wirkspektrum von Ambruticin S.....	7
Tab. 3: Die zum Minimalmedium bzw. Minimalmedium ohne Glucose zugegebenen Zucker und Aminosäuren sowie deren Konzentrationen im Medium.....	14
Tab. 4: Die zu Minimalmedium zugegebenen Lipide und Nucleinsäuren sowie deren Konzentration im Medium .....	14
Tab. 5: Zusammensetzung der Zusatzlösungen .....	16
Tab. 6: Auf Kreuzresistenzen zwischen <i>H. anomala</i> und <i>H. anomala</i> R <sup>Amb</sup> untersuchte Antibiotika sowie deren höchste untersuchte Konzentration .....	19
Tab. 7: Reaktionsansätze zur Ambruticin VS-1 Synthese mit unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen.....	23
Tab. 8: Reaktionsansatz zur Ambruticin VS-1 Synthese mit unterschiedlicher Reaktionszeit	24
Tab. 9: Reaktionsansätze zur Ambruticin VS-1 Synthese mit unterschiedlichen Lösungsmitteln sowie zur Herstellung der Nebenprodukte der Reaktion .....	24
Tab. 10: Unterschiedliche Konzentrationsverhältnisse bei Reaktionsansätzen zur Ambruticin VS-1 Synthese .....	25
Tab. 11: R <sub>F</sub> -Werte für die Ambruticine VS-1 – VS-5 .....	25
Tab. 12: Füllschema für den Toxizitätstest (umgesetztes Lösungsmittel) sowie die MHK-Bestimmung mit umgesetztem Ambruticin und die Kontrolle mit der Ambruticin-Stammlösung.....	25
Tab. 13: Vergleich der HPLC-Peaks vom Zellextrakt nach Zugabe von extremem Glycerin mit dem erwartetem Wert .....	31
Tab. 14: Extinktionswerte (340 nm) für die mittels HPLC getrennten Glycerinfraktionen nach dem Glycerin-Dehydrogenase-Test.....	32
Tab. 15: R <sub>F</sub> -Werte für Referenzlipide für das Laufmittel Heptan/Diisopropylether/Eisessig (70:30:1, v/v/v) .....	34
Tab. 16: Einfluß des pH-Wertes auf die MHK für Ambruticin VS-3 .....	41
Tab. 17: MHK von Ambruticin bei Wachstum mit verschiedenen organischen Säuren .....	42
Tab. 18: MHK-Werte von Ambruticin bei Wachstum auf Minimalmedium bzw. Minimalmedium ohne Glucose mit verschiedenen C-Quellen .....	42
Tab. 19: MHK-Werte von Ambruticin bei Wachstum auf Minimalmedium mit ausgewählten Lipiden, Nucleinsäuren bzw. Vitamincocktail .....	42
Tab. 20: MHK-Werte für Ambruticin nach Wachstum auf Minimalmedium mit verschiedenen N-Quellen .....	43
Tab. 21: MHK-Bestimmung von <i>H. anomala</i> und <i>H. anomala</i> R <sup>Amb</sup> Protoplasten in verschiedenen Medien.....	48

Tab. 22: Wachstum von Protoplasten nach Behandlung mit Liposomen mit unterschiedlichem (theoretisch maximalem) Ambruticin oder Propidiumjodid Gehalt .....	49
Tab. 23: Einfluß von Liposomen auf die Stoffwechselaktivität von L929-Mauszellen, gemessen als WST-1 Färbung (OD <sub>450</sub> ) nach 24 h .....	49
Tab. 24: MHK-Werte verschiedener Antibiotika für <i>Hansenula</i> .....	52
Tab. 25: Toxizität der Nebenprodukte sowie MHK-Bestimmung des umgesetzten Ambruticins .....	58

# **1 Einleitung**

## **1.1 Myxobakterien**

Myxobakterien sind Gram-negative, strikt aerobe, chemoorganotrophe Bodenbakterien. Die vegetativen Zellen sind 2–8 µm lange Stäbchen mit hoher Flexibilität, da ihr Mureinsacculus nicht durchgängig sondern fleckenweise aufgebaut ist. In den Zellmembranen enthalten sie ungewöhnliche Fettsäureester von Carotinoidglycosiden, z.B. Myxobacton oder Myxobactin. Die meisten Myxobakterien ernähren sich bakteriolytisch, lediglich die Sorangien können auch cellulolytisch leben. Da für diese Ernährungsweisen Exoenzyme notwendig sind, leben Myxobakterien in Schwärmen, der Schwarmverband wird durch produzierte Schleime und darin enthaltene chemotaktische Stoffe aufrechterhalten. Charakteristisch ist der mit 66 – 72 mol% hohe GC-Gehalt der DNA und ferner haben sie ob ihres komplexen Lebenszyklusses mit  $10^7$  bp ein für Bakterien sehr großes Genom [36]. Myxobakterien können sich gleitend auf festem Untergrund fortbewegen, mit typischen 1 – 20 µm/min sind sie jedoch erheblich langsamer als begeißelte Bakterien. Unter ungünstigen Lebensbedingungen können sie 20 – 800 µm große Fruchtkörper ausbilden; dafür aggregieren mehrere Millionen Zellen, die sich anschließend zur Sporangienhülle bzw. den Myxosporen differenzieren. Diese Myxosporen sind sehr resistent gegen UV-Strahlung und Trockenheit, jedoch weniger gegen Hitze. Unter günstigen Umweltbedingungen keimen die Myxosporen wieder zu vegetativen Zellen aus [12; 54].

Viele Myxobakterien haben einen ausgeprägten Sekundärmetabolismus und bilden eine Vielzahl von Pigmenten und Antibiotika. Bis 1999 wurden 90 verschiedene, meist bisher unbekannte Basisstrukturen sowie 450 Strukturvarianten von Sekundärmetaboliten entdeckt. Damit nehmen die Myxobakterien den 3. Platz hinter den Actinomyceten und Bacillen unter den Antibiotika-produzierenden Bakterien ein [55; 56].

## **1.2 Antibiotika**

### **1.2.1 Definition**

Nach einer ursprünglichen, von Waksman modifizierten Definition aus dem Jahre 1941 sind Antibiotika im engeren Sinne von Mikroorganismen produzierte niedermolekulare Metabolite ( $M_G < 2.000$  g/mol), die bereits in niedrigen Konzentrationen ( $< 200$  µg/ml) das Wachstum anderer Mikroorganismen hemmen oder sie abtöten [zit. in 23]. Chemikalien mit solchen Eigenschaften (z.B. Azide) werden als Biozide bezeichnet. Enzyme (z.B. Lysozym) oder komplexe Proteine sind demnach keine Antibiotika, weil sie zu groß sind, andere mikrobielle Stoffe (z.B. Ethanol) nicht, weil sie nur in hohen Konzentrationen wirksam sind. Diese enge Definition wurde um die chemisch modifizierten Antibiotika (halbsynthetisch), chemischen

Nachsynthesen (Chemotherapeutika) sowie Metabolite aus höheren Tieren und Pflanzen erweitert. Heutzutage wird der Begriff „Antibiotika“ oftmals als Synonym für alle Stoffe verwendet, die nicht nur wachstumshemmend oder abtötend auf pathogene Mikroorganismen (inkl. Viren) sondern auch auf höhere Organismen (z.B. Parasiten) oder Zellen (z.B. Krebszellen) wirken [23].

Die Hauptproduzenten von Antibiotika im engeren Sinne sind die Actinomyceten (*Streptomyces*) mit ca. 65 %, gefolgt von den Pilzen (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Cephalosporium*) mit ca. 25 % und den übrigen Bakterien (Pseudomonaden, Bacillen, Myxobakterien) mit etwa 10 %. 1995 waren etwa 8.000 Antibiotika im engeren Sinne bekannt, davon wurden kommerziell 123 fermentativ und 50 halbsynthetisch (z.B.  $\beta$ -Lactame, Makrolide, Aminoglycoside, Tetracycline) produziert, totalsynthetisiert wurden nur wenige Antibiotika (z.B. Pyrrolnitrin, Chloramphenicol). Darüber hinaus waren noch ungefähr 4.000 Antibiotika aus höheren Organismen, vor allem Pflanzen, bekannt [18].

### 1.2.2 Wirkmechanismus

Antibiotika können wachstumshemmend (-statikum) oder letal (-zid) wirken. Die häufigsten Angriffspunkte sind Transkription (z.B. Myxopyronin, Sorangicin), Translation (z.B. Angiolam, Myxovalargin), DNA-Replikation (z.B. Saframycin), Zellwandsynthese (z.B. Penicilline), Cytoplasmamembran (z.B. Amphotericin B, Gramicidin A) oder die Atmungskette (z.B. Myxothiazol, Myxalamide). Darüber hinaus gibt es noch Wirkungen, wie Hemmung des Eisentransportes (z.B. Myxocheline), Antimetabolite (z.B. Sulfonamide), Hemmung der Biosynthese von Zellbausteinen wie Aminosäuren, Zucker, Nucleoside, Lipide (z.B. Soraphen) sowie Wirkung auf das Cytoskelett (z.B. Epothilone, Tubulysine).

Antibiotika können auf unterschiedliche Weise ihre Wirkung entfalten. Oftmals werden Enzyme inhibiert (reversibel oder irreversibel), z.B. durch Konformationsänderung am Enzym; dafür muß das Antibiotikum nicht notwendiger Weise mit dem katalytischen Zentrum wechselwirken. Das Antibiotikum kann auch einen Cofaktor oder das Substrat verdrängen, weil es besser am katalytischen Zentrum bindet. Antibiotika können aber auch enzymkatalysiert zu Produkten führen, mit denen keine weiteren Synthesen mehr möglich sind (Dead-End-Synthesen). Möglich sind auch Interaktionen mit Rezeptoren oder Störung der Membranfunktion.

### 1.2.3 Fungizide

Fungizid wird als Begriff im Nutzpflanzenschutz verwendet, während im medizinischen Bereich von Antimykotika gesprochen wird. Antibiotika die gegen eukaryontische Zellen wirken sollen sind wegen der zellulären Ähnlichkeiten mit den zu schützenden Zellen schwierig zu finden. Hefen und Pilze haben aber einige spezielle Stoffwechseleigenschaften,

die sie von tierischen und pflanzlichen Zellen unterscheiden, so daß diese geeignete Angriffspunkte für Antimykotika sind.

#### **1.2.3.1 Ergosterinsynthese**

Die meisten Antimykotika wirken auf verschiedenen Ebenen gegen die Ergosterinsynthese, ein Sterin, das die Säugerzellen nicht bilden. Die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reductase wird von Compactinen (z.B. Lovastatin), die Squalenepoxidase von Allylaminen (z.B. Terbinafin) und Thiocarbamaten (z.B. Tolnaftat), die Lanosterin-14 $\alpha$ -methyl-Demethylase von Azolen (z.B. Miconazol) und die  $\Delta^{14}$ -Reductase sowie  $\Delta^7$ ,  $\Delta^8$ -Isomerase von Morpholinen (z.B. Amorolfin) inhibiert. Als Folge sinkt der Ergosteringehalt in der Membran, Methylsterine akkumulieren, so daß eine hyperfluide Membran entsteht [7; 41].

#### **1.2.3.2 Lipide und Membran**

Die Fettsäuresynthese kann durch Cerulein, welches die  $\beta$ -Ketoacylcarrier-Untereinheit der pro- und eukaryontischen Fettsäure-Synthetase inhibiert [23], oder Soraphen, welches die Acetyl-CoA-Carboxylase blockiert [52], unterbunden werden. Bestimmte organische Phosphorverbindungen (z.B. Edifenphos) hemmen die Methylierung von Phosphatityl-ethanolamin zu Phosphatidylcholin [42]. Dicarboxyimide (z.B. Vinclozolin) oder „aromatische Kohlenwasserstoff-Fungizide“ (z.B. Chloroneb) fördern eine Lipidperoxidation, beginnend an der inneren Mitochondrienmembran, und zerstören so die Membranfunktion [16]. Polyene (z.B. Amphotericin B, Nystatin) interagieren mit Membransterinen und bewirken Permeabilität, erst für Kationen, später auch für größere Metabolite [27].

#### **1.2.3.3 Zellwandsynthese**

Spezifischer als die Ergosterinsynthese-Inhibitoren wirken gegen die Zellwandsynthese gerichtete Antimykotika. Die Chitinsynthese inhibieren an der Chitin-Synthase Antimetabolite zu UDP-N-Acetylglucosamin (z.B. Polyoxin D oder Nikkomycin X) [19]. Die Glucan-synthese wird an der Glucan-Synthase durch Papulacandine (z.B. Papulacandin B) oder Echinocandine (z.B. Cilofungin) inhibiert, indem die  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 6-Quervernetzung der  $\beta$ -1 $\rightarrow$ 3-Glucanfibrillen unterbunden wird [65]. Tetaine (z.B. Anticapsin) inhibieren als Glutamin-Analoga die Glutamin-Fructose-6-phosphat-Aminotransferase bei der UDP-N-Acetylglucosamin-Synthese [42].

#### **1.2.3.4 Atmungskette**

Carbamide (z.B. Carboxin) hemmen die Succinat-Dehydrogenase (Komplex II), Methoxyacrylate (z.B. Strobilurin A) hemmen den Elektronentransport am Komplex III. Zwar wirken Atmungsketteninhibitoren meist auch toxisch auf tierische Zellen [42], doch ist es gelungen, totalsynthetische Analoga mit stark reduzierter Cytotoxizität zu entwickeln (BASF, Zeneca).

### 1.2.3.5 Nucleinsäuren

5-Fluorcytosin wird bei Pilzen zu 5-Fluoruracil desaminiert und fungiert dann in Form von 5-Fluor-dUMP als Thymidylat-Synthase-Inhibitor, so daß die DNA-Synthese gestoppt wird. 5-Fluorcytosin kann auch zu 5-Fluor-UTP oder 5-Fluor-CTP metabolisiert werden und so zu abnormaler mRNA führen [42]. Hydroxypyrimidine (z.B. Diazinon) inhibieren die Adenosin-Desaminase [29] und Phenylamide (z.B. Metalaxyl) inhibieren die RNA-Polymerase I und unterbinden somit die rRNA-Synthese [24].

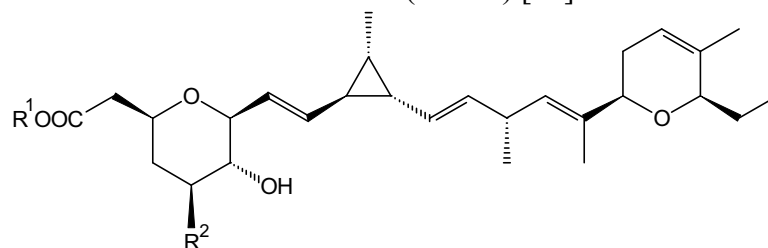
### 1.2.3.6 Sonstige Angriffspunkte

Griseofulvin bewirkt durch Interaktion mit den Mikrotubuli assoziierten Proteinen (MAPs) antimitotische Effekte (multinucleate Zellen), der genaue Wirkmechanismus ist allerdings noch unbekannt [27]. Benzimidazole (z.B. Benomyl) binden an  $\beta$ -Tubulin, so daß die Mikrotubuli Polymerisation und somit die Mitose gestört wird [32].

## 1.3 Ambruticin

1977 publizierten Ringel et al. von der Firma Warner & Lambert die erste Struktur eines Antibiotikums aus Myxobakterien. Produziert wurde es von *Polyangium cellulosum* var. *fulvum* ATCC 25532 (heute *Sorangium cellulosum*) und trug anfänglich die Bezeichnung W7783, später wurde es als Ambruticin bezeichnet [60]. Conner et al., ebenfalls bei Warner & Lambert, veröffentlichten im selben Jahr die Strukturaufklärung (Abb. 1). Es handelte sich um eine Cyclopropyl-polyensäure und gehörte damit zu einer völlig neuen Klasse von Antibiotika [13]. Die absolute Konfiguration von Ambruticin klärten drei Jahre später Just und Potvin auf [39]. Kende et al. gelang 1993 die Totalsynthese von Ambruticin<sup>1</sup> [39].

1991 konnten Höfle et al. an der GBF aus *So. cellulosum* die N-haltigen Ambruticine VS-1 bis VS-5 isolieren und deren Struktur aufklären (Abb. 1) [28].



R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Ambruticin	M <sub>G</sub> [g/mol]	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Ambruticin	M <sub>G</sub> [g/mol]
H	OH	S	474,6	H	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> <sup>+</sup>	VS-1	516,7
H	NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	VS-5	474,7	CH <sub>3</sub>	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> <sup>+</sup>	VS-2	530,7
H	NH <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> ) <sup>+</sup>	VS-4	488,7	H	NOH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> <sup>+</sup>	VS-3 N-Oxid	518,7
H	NH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> <sup>+</sup>	VS-3	502,7				

Abb. 1: Strukturformeln und Molgewichte der Ambruticine S bzw. VS

<sup>1</sup> Dieses Ambruticin wurde von Höfle et al. zur Unterscheidung als Ambruticin S bezeichnet [28]

Die Bezeichnung „S“ bzw. „VS“ bedeutet entsprechend dem Laufverhalten bei der DC-Trennung „slow“ bzw. „very slow“.

### 1.3.1 Produktion und Isolierung

Produziert wurden die Ambruticine VS von *So. cellulosum* Stamm So ce10 in einem Stärke-Sojamehl-Hefeextrakt-Medium bei 32 °C und pH 7,2 im Bioreaktor [20]. Die Ambruticine wurden während der Fermentation mit dem Adsorberharz XAD-1180 kontinuierlich extrahiert. Danach wurden aus dem abgesiebten und mit Wasser gewaschenem XAD mit Methanol die Sekundärstoffe extrahiert und chromatographisch (Sephadex LH-20) getrennt. Die Ambruticin-Fraktion wurde eingengt, dreimal mit Ethylacetat extrahiert, die organische Phase bis zur Trockene eingengt, in Methanol wieder aufgenommen und erneut über eine Sephadex LH-20-Säule gegeben. Anschließend wurden die Ambruticine chromatographisch (RP-18, Laufmittel Methanol/0,05 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$ , pH 8,2) getrennt und zum Schluß die Fraktionen entsalzt. Es wurden hauptsächlich die Ambruticine VS-3 und VS-4, in kleinen Mengen VS-1 und VS-5 und in Spuren VS-1 sowie VS-3 N-Oxid gebildet [28]. Zur Produktion und Isolierung von Ambruticin S siehe Ringel et al. [60].

Synthetisiert wird Ambruticin an Polyketid-Synthetasen aus Acetyl- und Propionyl-Monomeren analog zur Makrolidsynthese. Als Methyl-Donator dient S-Adenosylmethionin, der Stickstoff stammt aus einer Transaminierung [20].

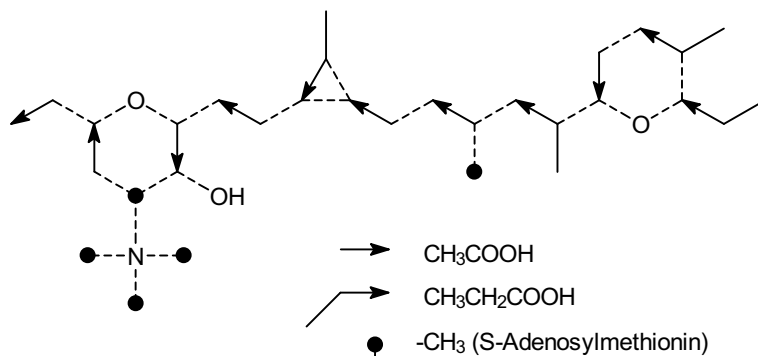


Abb. 2: Synthesebausteine für Ambruticin VS-1 [20]

### 1.3.2 Chemische Eigenschaften von Ambruticin

Die lipophilen Ambruticine sind gut in Methanol/Wasser-Mischungen sowie in sauren und alkalischen wäßrigen Lösungen löslich, während sie in reinem Wasser, in wäßrigem Ethylacetat oder in Chloroform Micellen bilden. Einige Eigenschaften der Ambruticine VS sind in Tab. 1 dargestellt, Abb. 3 zeigt das IR-Spektrum von Ambruticin VS-3.



Tab. 1: Vergleich einiger Eigenschaften der Ambruticine VS [28]

Ambruticin	Farbe	S <sub>p</sub> [°C]	DC <sup>1)</sup> R <sub>f</sub>	HPLC <sup>2)</sup> R <sub>t</sub> [min]	UV (Methanol) λ <sub>max</sub> [nm] (ε)
VS-5	weiß-amorph		0,70	7,5	240 (4.000); 220 (18.300)
VS-4	weiß-amorph	137–141	0,51	8,2	240 (4.500); 220(22.500)
VS-3	weiß-amorph	97–116	0,32	9,3	240 (3.700); 220 (19.600)
VS-1	weiß-amorph	155–159	0,15	11,8	240 (4.900); 220 (21.500)
VS-2	farblos, ölig		0,25 <sup>3)</sup>	14,1	240 (4.100); 220 (19.200)
VS-3 N-Oxid	farblos, ölig		0,35	4,8	240 (5.000); 220 (22.700)

<sup>1)</sup> Silicagel S 60 F<sub>254</sub> (Merck), Laufmittel: 2 % (v/v) Eisessig in Methanol

<sup>2)</sup> Nucleosil RP-18, 10 μm 250 × 4 mm (Macherey-Nagel), Laufmittel Methanol/0,05 M NH<sub>4</sub>Ac pH 8,2 (78:22), Fließgeschwindigkeit 1,5 ml/min

<sup>3)</sup> verschmiert

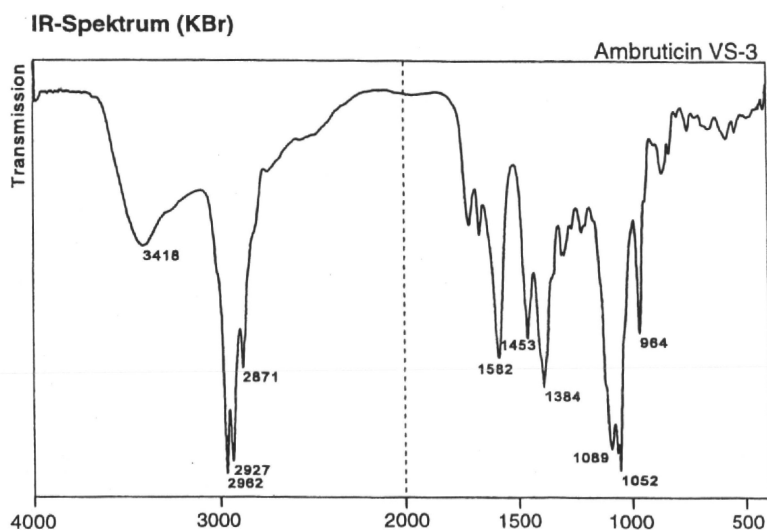


Abb. 3: Infrarot-Spektrum von Ambruticin VS-3 [20]

### 1.3.3 Bisherige Untersuchungen

Seit 1977 wurde mehrfach versucht, den Wirkmechanismus von Ambruticin aufzuklären. Ringel et al. hatten gezeigt, daß Ambruticin S gegen eine Vielzahl von pathogenen Pilzen wirkte (Tab. 2). Die Protein- und RNA-Synthese wurde bei *Microsporum fulvum* erst spät inhibiert (Einbau von <sup>14</sup>C-Präkursoren), und die Zellen wurden binnen 2 h nicht permeabel (OD<sub>260</sub>-Messung). Stoffwechselinaktive Zellen waren nicht sensitiv gegen Ambruticin S [58; 60].

Tab. 2: Wirkspektrum von Ambruticin S [58; 60]

empfindlich (MHK < 0,2 µg/ml)	wenig empfindlich	unempfindlich (MHK > 10 µg/ml)
<i>Coccidioides immitis</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
<i>Epidermophyton floccosum</i>	<i>Mucor pusillus</i> , <i>M. hiemalis</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Microsporum fulvum</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Blastomyces dermatitidis</i>	<i>Alternaria tenuis</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Histoplasma capsulatum</i>		<i>Diplococcus pneumoniae</i>
<i>Rhizopus nigricans</i>		<i>Bacillus cereus</i>
LD <sub>50</sub> (Maus): intravenös 315 mg/kg, oral > 1.000 mg/kg		

Simpkins Untersuchungen von 1985 erbrachten, daß *Candida parapsilosis* binnen 30 min keine erhöhte Zellpermeabilität aufwies (OD<sub>280</sub>-Messung) und daß organische Säuren wie Acetat, Succinat und Glutamat einen leichten antagonistischen Effekt hatten. Die Aufnahme von <sup>14</sup>C-markierten Aminosäuren wurde nach 30 min inhibiert - allerdings ist *C. parapsilosis* aminosäureautark. Vermutet wurde, daß die Reduktion der Aminosäureaufnahme die Folge eines metabolischen Blocks im Kohlenhydratstoffwechsel sei, weshalb den Zellen nicht genügend Energie zur Verfügung steht [64].

1994 konnte Schlüter feststellen, daß eine Vielzahl von Biosynthesen (DNA, RNA, Proteine, Lipide, Zellwand) bei *Hansenula anomala* durch Ambruticin VS-3 erst spät inhibiert wurden und ebenso die CO<sub>2</sub>-Freisetzung aus Glucose. Bestätigt werden konnte, daß die Membranintegrität der Zellen binnen 2 h nicht zerstört worden war (Efflux von <sup>14</sup>C-Isoaminobutyrat) und daß einige organische Säuren leicht antagonistisch wirkten. Metabolisch inaktive Zellen (in Puffer ohne Glucose) waren gegen Ambruticin nicht sensitiv, die spontane Resistenzrate betrug etwa 10<sup>-8</sup> [62].

1996 erkannten Gerth et al. eine Kreuzresistenz zwischen den Ambruticinen, Jerangoliden und Pyrrolnitrin. Dabei weisen Ambruticine und Jerangolide eine hohe chemische Ähnlichkeit auf, Pyrrolnitrin hingegen hat eine völlig andere chemische Struktur, so daß eine Kreuzresistenz a priori nicht erwartet werden konnte (Abb. 4) [21].

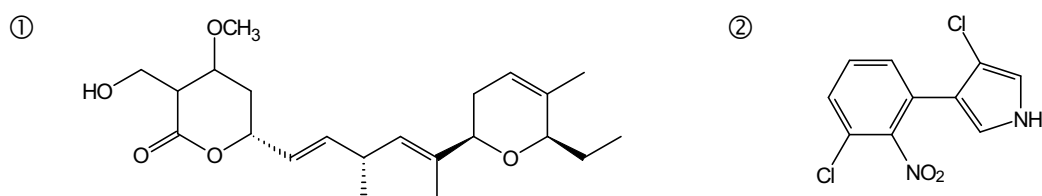


Abb. 4: Chemische Strukturformeln von ① Jerangolid A (C<sub>23</sub>H<sub>38</sub>O<sub>5</sub>, M<sub>G</sub> 394,55) und ② Pyrrolnitrin (C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, M<sub>G</sub> 257,07)

## 1.4 Ziel dieser Arbeit

Allgemein kann man nach folgendem Schema an das Problem der Wirkmechanismusaufklärung herangehen [42; 45]:

- 1) Auswahl eines geeigneten Testorganismus, der einfach zu bearbeiten ist und sehr sensitiv auf das Antibiotikum reagiert, damit auch schnelle Reaktionen erkannt werden können.
- 2) Erfassen von grundlegenden Parametern, wie Einfluß von Inokulumgröße, Vorinkubation und pH-Wert auf das Wachstum bzw. die Vermehrungsfähigkeit sowie Wirkung auf die Zellmorphologie.
- 3) Einfluß auf die Atmungskette, da eine Hemmung des Katabolismus oder der Nährstoffaufnahme zu einem Energiemangel in den Zellen führt, so daß als Folge alle anabolen Stoffwechselprozesse zum Erliegen kommen.
- 4) Untersuchung der Biosynthesen (in vivo) mit markierten Monomeren durch Aufnahme einer Kinetik, so daß vergleichend festgestellt werden kann, ob und welcher Syntheseweg sofort ( $\hat{=}$  Primäreffekt) oder spät ( $\hat{=}$  Sekundäreffekt) inhibiert wird.
- 5) Untersuchung des vermutlich inhibierten Stoffwechselweges in zellfreien Extrakten, um unterscheiden zu können, ob die Polymerisation oder die Präkursor-Synthese inhibiert wird.
- 6) Untersuchung der Biosynthese (in vitro) mit einem aufgereinigten Enzymsystem, um festzustellen, welcher Bestandteil des Enzymkomplexes vom Antibiotikum inhibiert wird.

Allerdings gab es bei den bisherigen Untersuchungen zur Aufklärung des Wirkmechanismus von Ambruticin keinerlei deutliche Hinweise auf den Wirkort. In erster Linie wurde durch Verfüttern von radioaktiv markierten Präkursoren und Messung der Radioaktivität in den entsprechenden Biopolymeren versucht, eine Hemmung des Anabolismus nachzuweisen. Die Synthesen für Lipide, Proteine, DNA, RNA und Zellwand liefen zwischen 0,5 – 2 h langsam aus, so daß von Sekundäreffekten ausgegangen wurde. Bezüglich des Energiestoffwechsels wurde beobachtet, daß Metabolite aus dem Citrat-Zyklus leicht antagonistisch wirkten und die CO<sub>2</sub>-Freisetzung aus Glucose erst nach 1,5 h deutlich gesenkt wurde; aber auch diese Hinweise auf eine Beeinträchtigung des Katabolismus dürften eher ein Sekundäreffekt sein.

Aus den bisherigen Ergebnissen ergeben sich zwei grundsätzliche Probleme, die folgende Ursachen haben könnten:

Langsame und anscheinend unspezifische Wirkung

- (langsame) aktive Aufnahme
- Akkumulation bis zu einer Schwellenkonzentration
- (langsame) Metabolisierung zu einer aktiven Form
- (anfängliche) Kompensation des Effektes durch Stoffwechselnebenwege
- schwache Bindung am Zielmolekül
- ein großer Präkursorpool läßt Inhibierung der Präkursorsynthese erst spät erkennen

- keine spezifische Wirkung, da Ambruticin als „multisite“ Inhibitor wirkt

Resistenzmechanismus

- Aufnahmeresistenz durch verminderte Aufnahme oder erhöhtes Ausschleusen

- keine Aktivmetabolisierung

- Detoxifikation

- Ausbildung eines Stoffwechselnebenweges zur Umgehung eines metabolischen Blocks

- Wirkortresistenz durch Verminderung der Bindung am Zielmolekül

- gleicher Resistenzmechanismus für Bakterien, Pilze und tierische Zellen?

Es sollte der von Ambruticin beeinflusste Stoffwechselweg entdeckt und daraufhin das Zielmolekül, an dem Ambruticin bindet, isoliert und charakterisiert werden. Dafür mußten die grundsätzlichen Probleme zur Metabolisierung und Aufnahme von Ambruticin (siehe oben) geklärt werden. Diese Arbeiten können mit markiertem  $^{14}\text{C}$ -Ambruticin durchgeführt werden. Darüber hinaus könnte mit  $^{14}\text{C}$ -Ambruticin auch die betroffene Zellorganelle erkannt werden, um die Suche nach dem spezifischen Zielmolekül weiter einzugrenzen.

Es ist sehr schwierig aus der Struktur eines Antibiotikums dessen Zielmolekül vorherzusagen, wenn es sich entweder um eine völlig neue Struktur oder um ein neues Zielmolekül handelt. Damit sind für Ambruticin die Erfolgsaussichten, durch Struktur-Wirkungsvergleich ein potentiell Zielmolekül zu finden, gering; z. B. konnte nicht (im voraus) erkannt werden, daß Miconazol mit 24-Methylendihydrolanosterin konkurriert [42].

Da bisher kein Wirkort für Ambruticin gefunden worden ist, könnte es sich um ein völlig neuen Wirkmechanismus handeln. Dieses macht Ambruticin als neues Antimykotikum sehr interessant, denn die bisherigen Antimykotika und Fungizide greifen nur wenige Zielmoleküle an (vgl. 1.2.3). Neue Antimykotika sind durchaus begehrt, da vermehrt Mykosen auftreten, vor allem bei Patienten mit Immunschwäche wie AIDS, Krebs oder nach Organtransplantationen [59]. Ambruticin hat den Vorteil, daß es untoxisch für Säugetiere ist, hat allerdings auch den Nachteil, daß es an Serumbestandteilen adsorbiert und nicht gegen *C. albicans* wirkt. Können jedoch der Wirkmechanismus und der Resistenzmechanismus aufgeklärt werden, wäre über Drug-Design eventuell Abhilfe möglich.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Geräte und Chemikalien

Glasgeräte wurden für 4 h bei 160 °C sterilisiert oder für mindestens 20 min bei 121 °C autoklaviert.

Neben den üblichen Laborgeräten wurden folgende spezielle Gerätschaften verwendet:

Automatic TLC-Linear Analyzer Tracemaster 20, Fa. Berthold

Begasungsbrutschrank CO<sub>2</sub>-Auto-Zero, Fa. Heraeus

Dismembrator, Fa. Braun

Lumineszenzmeßgerät Biolumat LB 9500 T, Fa. Berthold

Mikrotiterplattenphotometer Titertek Multiscan MCC 1340, Fa. ICN

Puls Field Gel Elektrophorese CHEF-DR II, Fa. Bio-Rad

Multi-purpose Scintillation Counter LS 6500, Fa. Beckman

Alle verwendeten Chemikalien der Firmen Amersham, Bayer, Boehringer Mannheim, Fluka, GibcoBRL, Merck, NEN, Pharmacia, Riedel de Haën, Roth, Serva und Sigma waren von pro-analysis-Qualität. Statt destilliertem Wasser wurde vollentsalztes Wasser (Millipore), im folgenden als A. dest. bezeichnet, verwendet. War der Hersteller von Chemikalien oder Verbrauchsmaterialien wichtig, wurde dieser extra angegeben.

### 2.2 Lösungen und Puffer

Wäßrige Lösungen wurden entweder durch 20 – 30-minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisiert oder sterilfiltriert.

Ambruticin VS-3: Eine Stammlösung mit 1 mg/ml in Methanol sowie eine methanolische Verdünnungsreihe wurde bei -20 °C gelagert. Wenn nicht anders beschrieben, wurden diese Lösungen mit sterilfiltriertem Tris-Puffer 1:10 verdünnt und als solche Lösung eingesetzt (Lagerung bei 4 °C). Zu den Kontrollen wurde entsprechend 1:10 verdünntes Methanol gegeben.

EBS-Puffer: 5,5 mM Glucose × H<sub>2</sub>O, 5,4 mM KCl, 116,4 mM NaCl, 26,2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O, 0,05 mM Phenolrot

Jerangolid A: Eine Stammlösung mit 1 mg/ml in Methanol wurde bei -20 °C gelagert. Davon wurden mit sterilfiltriertem Tris-Puffer Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen angesetzt und bei 4 °C gelagert.

Pyrrolnitrin: Eine Stammlösung mit 0,5 mg/ml in Ethanol wurde bei 4 °C gelagert. Davon wurden mit sterilfiltriertem Tris-Puffer Lösungen mit verschiedenen Konzentrationen angesetzt.

Tris-Puffer: 20 mM Tris, pH 7,0

PMSF-Stammlösung: 17,4 mg PMSF in 1 ml Isopropanol aliquotiert bei -20 °C gelagert

Protease-Inhibitor Cocktail 1 (1.000 ×): 208 mg p-Aminobenzamidin, 131 mg ε-Aminocaprinsäure, 5 mg Aprotinin, 1 mg Leupeptin in 1 ml A. dest. Aliquotiert bei -20 °C gelagert [4]

Protease-Inhibitor Cocktail 2 (1.000 ×): 88 mg PMSF, 5 mg Pepstatin A, 1 mg Chymostatin in 1 ml DMSO. Aliquotiert bei -20 °C gelagert [4]

Zellaufschlußpuffer: 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM Tris, 1 mM KCl, 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM Benzamidin, pH 7,5. 0,1 mM PMSF sowie 0,1 % (v/v) Protease-Inhibitor Cocktail 1 und 2 wurden täglich frisch zugegeben.

## 2.3 Stammhaltung und Kultivierung

Die Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Ambruticin wurden mit dem Stamm *Hansenula anomala* und einer spontanen Resistenzmutante *H. anomala* R<sup>Amb</sup> durchgeführt.

Weitere Untersuchungsorganismen waren die Permeabilitätsmutanten *Saccharomyces cerevisiae* BT 27C-3A bzw. 25125-2A sowie die Zellkulturlinie L929 (NCTC clone 929, ATCC CCL1) aus dem subkutanen Gewebe einer männlichen C3H/An-Maus.

### 2.3.1 Medien

Alle Medienbestandteile wurden in 1 l A. dest. gelöst und direkt nach dem Ansetzen bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Bei Festmedien wurden zusätzlich 20 g Agar zugegeben.

#### 2.3.1.1 Malzextrakt-Medium

30 g Malzextrakt (Nr. 0186-17-7, Fa. Difco) und 3 g Pepton aus Casein (Nr. 0118-01, Fa. Difco)

#### 2.3.1.2 Minimalmedium

2 g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g MgSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O, 0,1 g NaCl, 0,1 g CaCl<sub>2</sub> × 6 H<sub>2</sub>O, 0,1 g/l Hefeextrakt mit Vitamin B (Nr. 0127-17-9, Fa. Difco) und 1 ml Spurenelementlösung. 10 g Glucose × H<sub>2</sub>O, gelöst in 30 ml A. dest., wurde nach dem Autoklavieren sterilfiltriert zugegeben. Für Agarplatten mit 0,5 µg/ml Ambruticin wurden nach dem Autoklavieren 20 ml methanolische Ambruticin-Lösung (25 µg/ml) pro Liter Medium zugegeben.

#### 2.3.1.3 Spurenelementlösung

Zusammensetzung der Spurenelementlösung nach Barnett et al. [6]: 500 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 400 mg MnSO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O, 400 mg ZnSO<sub>4</sub> × 7 H<sub>2</sub>O, 200 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O, 200 mg FeCl<sub>3</sub> × 6 H<sub>2</sub>O, 100 mg KJ, 40 mg CuSO<sub>4</sub> × 5 H<sub>2</sub>O

#### 2.3.1.4 Casamino acid-Medium

Glucose-freies Medium aus 10 g Casamino acids (Nr. 0230-01, Fa. Difco), 3 g Pepton (Nr. 0118-01, Fa. Difco), 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g NaCl, 0,1 g  $\text{CaCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$  und 1 ml Spurenelementlösung

#### 2.3.1.5 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DME)

DME mit L-Glutamin und 4,5 g/l Glucose (Fertigpulver der Firma GibcoBRL) wurde supplementiert mit 3,7 g/l  $\text{NaHCO}_3$  und 10% (v/v) nativem Kälberserum (Fa. GibcoBRL). Dieses Medium wurde mit einer Millipore Filtrationsanlage (XX 80202 30) und Einwegsterilfiltern (Sterivex-GS) sterilfiltriert.

### 2.3.2 Stammhaltung

Von *H. anomala* und *S. cerevisiae* dienten als Arbeitskulturen Ausstriche auf Minimalmedium-Agarplatten, die bei 4 °C gelagert wurden. Als Stammkultur dienten Schrägagarröhrchen mit Malzextrakt-Medium und Schraubverschluß, die ebenfalls bei 4 °C gelagert wurden.

### 2.3.3 Kultivierung

Für Übernachtskulturen wurden die Hefen von einer Agarplatte in 30 – 40 ml Malzextrakt-Medium in einen 100-ml-Erlenmeyerkolben gegeben und für 14 – 18 h bei 30 °C mit 160 U/min auf einem Rundschüttler inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 2 min bei 5.000 g abzentrifugiert, mit etwa 20 ml A. dest. gewaschen und in 10 ml A. dest. resuspendiert. Mit einer Thoma-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt, um die Versuche mit einem definierten Inokulum, üblicherweise  $10^6$ – $5 \times 10^7$  Zellen/ml, durchführen zu können. 20–30 ml Ansätze in 100-ml-Erlenmeyerkolben wurden 1–2 h bei 30 °C und 130 U/min vorinkubiert; Mikrotiterplatten wurden nicht vorinkubiert und nicht geschüttelt.

Die L929 Mauszellen wuchsen in 50-ml-Gewebekulturflaschen (Fa. Greiner) in 10 ml DME-Medium im Brutschrank bei 37 °C, >95% Luftfeuchtigkeit und 10%  $\text{CO}_2$ . Zur Subkultivierung wurden die adhärent wachsenden L929 Zellen einmal mit EBS-Puffer gewaschen und anschließend mit 0,25%iger Trypsinlösung (GibcoBRL) abgelöst. Danach wurden 10 ml frisches DME-Medium zugegeben und die Zellzahl dieser Suspension mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Frisches DME-Medium wurde nun mit  $10^5$  Zellen/ml inokuliert und in Mikrotiterplatten mit 48 bzw. 96 Vertiefungen zwei Tage vorinkubiert.

## 2.4 Minimale Hemmkonzentration (MHK)

Die MHK für *H. anomala* wurde in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen mit  $10^6$  Zellen/ml in 135  $\mu$ l Minimalmedium und 15  $\mu$ l Ambruticin-Lösung verschiedener Konzentrationen (0,005 – 10  $\mu$ g/ml) bestimmt. Inkubiert wurde bei 30 °C für 24 h, das Wachstum wurde als OD<sub>620</sub> bestimmt (Standardmethode). Die MHK wurde zusätzlich für *H. anomala* R<sup>Amb</sup> und *S. cerevisiae* bestimmt.

Bestimmt wurde der Einfluß der Inokulumgröße auf die MHK, indem das Inokulum zwischen  $10^2$ – $10^7$  Zellen/ml variiert wurde.

Der Einfluß der Vorinkubation auf die MHK wurde untersucht, indem das Ambruticin nach 0, 2, 4 oder 6 h zu den gestarteten Kulturen zugegeben wurde.

### 2.4.1 Absterbekurve

Absterbekurven für Ambruticin und Pyrrolnitrin wurden in 20 ml Minimalmedium mit  $10^6$  Zellen/ml aufgenommen. Der Ansatz bei 0 °C wurde (nach der Ambruticin-Zugabe) in einem Eisbad inkubiert. Die Proben wurden (wenn notwendig) mit A. dest. verdünnt, auf Minimalmedium-Agarplatten ausplattiert und für zwei Tage inkubiert.

### 2.4.2 pH-Wert

Da das Minimalmedium ungepuffert war und sich deshalb der pH-Wert im Laufe des Wachstums veränderte, sollte vorab bestimmt werden, ob dieses einen Einfluß auf die MHK hat. Dafür wurde Minimalmedium mit 50 mM Puffer verwendet: MES für pH 5,0 und 6,0 sowie HEPES für pH 7,0 und 8,0. Die MHK-Bestimmung erfolgte nach der Standardmethode.

### 2.4.3 Antagonisten

Die Untersuchung auf Antagonisten zu Ambruticin ist eine Variation der MHK-Bestimmung und wurde ebenfalls in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen mit  $10^6$  Zellen/ml in Minimalmedium oder Minimalmedium ohne Glucose durchgeführt. Zu den Proben wurde 1% (v/v) Ambruticin als methanolische Lösung in Konzentrationen zwischen 0,005 – 10,0  $\mu$ g/ml zugegeben. Die organischen Säuren (Na-Pyruvat, Na- $\alpha$ -Ketoglutarat, Na-Acetat  $\times$  3 H<sub>2</sub>O, K-Glyoxylat, Na<sub>3</sub>-Citrat) wurden als Lösungen mit 10% (v/v) zugegeben, so daß deren Konzentration im Medium stets 10 g/l betrug. Das Wachstum wurde nach 24 h und 30 °C als OD<sub>620</sub> bestimmt.

Bei den nachfolgenden Untersuchung wurde zu den Proben 10% (v/v) Tris-gepufferte Ambruticin-Lösung zugegeben, um Pipettierfehler zu reduzieren (Standardmethode). Die zu untersuchenden Substanzen (Tab. 3) wurden als Lösungen mit 1–10% (v/v) zugegeben.



Tab. 3: Die zum Minimalmedium (MM) bzw. Minimalmedium ohne Glucose (MM ohne Glc) zugegebenen Zucker und Aminosäuren sowie deren Konzentrationen im Medium

Mediumzusatz (Zucker)	Konz. in MM ohne Glc [g/l]	Konz. in MM [g/l]	Mediumzusatz (Aminosäuren)	Konz. in MM ohne Glc [g/l]	Konz. in MM [g/l]
Glucose × H <sub>2</sub> O	10		Glutamat <sup>1)</sup>	~ 10	~ 1
Fructose	10		Lysin	10	1
Maltose	10		Valin <sup>1)</sup>	~ 10	~ 1
Galactose	10		Aspartat <sup>1)</sup>	~ 10	~ 1
Mannose	10	1	Serin	10	1
Glycerin	10	1	Methionin	10	1
Ribose	10		Homoserin	10	1
3-Phosphoglycerat	10	1	Cystein	10	1

<sup>1)</sup> Diese Aminosäuren waren nicht vollständig gelöst

Die folgenden Substanzen (Tab. 4) wurden nur in Minimalmedium mit Glucose getestet.

Tab. 4: Die zu Minimalmedium (MM) zugegebenen Lipide und Nucleinsäuren sowie deren Konzentration im Medium

Mediumzusatz	Konz. in MM	Mediumzusatz	Konz. in MM
Ergosterin	167 µg/ml	Vitaminelösung	<sup>1)</sup>
Fungal Lipids (Fa. Sigma)	33 µl/ml	Desoxyribose	10 mg/ml
Phosphatidylcholin-distearyl	167 µg/ml	dAdo, dCyd, dGuo, dThd	je 2,5 mg/ml
Linolsäure	33 µl/ml	dAMP, dCMP, dGMP, dTMP	je 2,5 mg/ml

<sup>1)</sup> Zusammensetzung der Vitaminelösung und deren Konz. im Medium [mg/l] p-Aminobenzoessäure (2), Biotin (1), Folsäure (100), Nicotinsäure (4), Pyridoxal-5-phosphat (100), Pyridoxin × HCl (4), Riboflavin (100), Thiamin (4)

Da *H. anomala* auch unterschiedliche Stickstoffquellen verwerten kann, wurde deren Einfluß auf die MHK untersucht. Neben dem üblichen Minimalmedium mit NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> wurde Minimalmedium mit KNO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oder Asparagin angesetzt, so daß das molare N-Verhältnis mit 0,025 mol/l N stets gleich blieb.

#### 2.4.4 Aerobe/anaerobe Kultivierung

Es wurde untersucht, inwieweit der Energiehaushalt einen Einfluß auf die MHK hat. Dafür wurden die Ansätze zur MHK-Bestimmung normal (also aerob), anaerob sowie aerob unter Energiemangel durch Zugabe des Entkopplers 2,4-Dinitrophenol kultiviert.

Zur anaeroben Kultivierung wurde in einem gasdichten Anaerobentopf ein System mit NaBH<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, Citrat und A. dest. gegeben, so daß an Palladium-überschichteten Alu-

miniumkugeln (Katalysator)  $H_2$  und  $CO_2$  gebildet wurde (BBL GasPak, Fa. Becton Dickinson). Die anaeroben Verhältnisse konnten während der ganzen Kultivierungszeit an Hand eines Indikatorstreifens überprüft werden.

Von 2,4-Dinitrophenol wurde eine gesättigte Lösung (18,4 g/l) hergestellt und in den angegebenen Verdünnungen zugegeben. Damit stand den Zellen zwar Sauerstoff als Oxidationsmittel für Biosynthesen zur Verfügung, nicht aber um über die Atmungskette ATP zu bilden.

Für *H. anomala* wurden in Vertiefung 1 einer Mikrotiterplatte 150  $\mu$ l Minimalmedium mit  $10^6$  Zellen/ml sowie 1,0  $\mu$ g/ml Ambruticin oder 1,0  $\mu$ g/ml Pyrrolnitrin oder 7,5  $\mu$ l 2,4-Dinitrophenol-Lösung gegeben. Diese Ansätze wurden im Gegensatz zur Standardmethode in 1:2-Schritten mit Minimalmedium mit  $10^6$  Zellen/ml bzw. mit Minimalmedium mit  $10^6$  Zellen/ml und 50  $\mu$ l/ml 2,4-Dinitrophenol-Lösung verdünnt. Für die Resistenzmutante wurden 10  $\mu$ g/ml Ambruticin oder 10  $\mu$ g/ml Pyrrolnitrin in 1:2-Schritten mit Minimalmedium mit  $10^6$  Zellen/ml verdünnt. Allerdings ist die MHK-Bestimmung mit 1:2-Verdünnungsschritten im Vergleich zur Standardmethode, bei der 10% (v/v) Ambruticin-Lösung zur Probe zugegeben wurde, weniger genau.

#### 2.4.5 Adsorption von Ambruticin an Zellen, Zellextrakten und Seren

Die MHK wurde in Gegenwart von *H. anomala*  $R^{Amb}$  Zellen, Zellextrakten bzw. Kaninchen-Serum bestimmt, um nach Faktoren suchen, die das Ambruticin auf sensitive Zellen weniger toxisch wirken lassen. Die MHK-Bestimmung erfolgte nach der Standardmethode in Mikrotiterplatten.

##### 2.4.5.1 Adsorption an Zellen

Die Adsorption von Ambruticin an Zellen wurde untersucht, indem 1,0 ml Minimalmedium bzw. A. dest. mit Zellen ( $10^7$  Zellen/ml, *H. anomala* bzw. *H. anomala*  $R^{Amb}$ ) und 10  $\mu$ g/ml Ambruticin 30 min lang bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend für 15 min bei 15.800 g zentrifugiert wurden. Die Ambruticin-Konzentration im Überstand wurde als Änderung der MHK im Vergleich zur Kontrolle (Minimalmedium ohne Zellen vorbehandelt) bestimmt. 150  $\mu$ l Überstand wurden in Vertiefung 1 einer Mikrotiterplatte gegeben und anschließend in 1:2-Schritten mit Minimalmedium mit  $10^6$  Zellen/ml (*H. anomala*) verdünnt. In Minimalmedium waren die Zellen stoffwechselaktiv, in A. dest. hingegen nicht, so daß zwischen physikalischer Adsorption und metabolischer Veränderung unterschieden werden konnte.

Mit 150  $\mu$ l Überstand wurde je eine Agarplatte inokuliert, um festzustellen, ob alle Zellen durch das Zentrifugieren pelletiert oder einige in die Ansätze zur MHK-Bestimmung verschleppt wurden.

### 2.4.5.2 Adsorption durch Zellextrakte

Die Hefezellen wurden mit  $10^9$  Zellen/ml in 1 ml Zellaufschlußpuffer in einem 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß suspendiert und mit 1 g Glasperlen ( $\varnothing = 0,5$  mm) bei 4 °C für 5 min am Dismembrator (10 mm Amplitude, 22 s mixen danach 8 s Pause) aufgeschlossen; der Zellaufschluß wurde variiert nach Gonzales und Siverio [22]. Die Zelltrümmer sowie Glasperlen wurden für 2 min bei 4 °C bei 5.000 g abzentrifugiert, der Überstand wurde sterilfiltriert (Millipore „Millex GV“, non pyrogenic, 0,22  $\mu$ m) und im Eisbad gelagert. Zum Medium wurden 10% (v/v) Zellextrakt sowie 1% (v/v) Zusatzlösung (siehe Tab. 5) gegeben. Als Kontrolle wurde die MHK nach Zugabe von Aufschlußpuffer bzw. *H. anomala* Zellextrakt bestimmt.

Tab. 5: Zusammensetzung der Zusatzlösungen

Zusatzlösung	Konz. [mg/ml]	Zusatzlösung	Konz. [mg/ml]
ATP, GTP	je 1	NAD, NADP	je 1
FAD, FMN	je 1	NADH, NADPH	je 1

### 2.4.5.3 Kaninchen-Serum

Das Kaninchen-Serum (Fa. Sigma) wurde in verschiedenen Konzentrationen (1 – 20 %, v/v) zum Minimalmedium mit  $10^6$  Zellen/ml *H. anomala* zugegeben. Es wurde auch unterschiedlich vorbehandeltes Serum mit 10% (v/v) zur Kultur gegeben; dafür wurden 0,5 ml Serum mit 20  $\mu$ l 3 M TCA angesäuert und nach 30 min mit 10  $\mu$ l 4 M Kalilauge neutralisiert oder 5 min auf 95 °C erhitzt oder ultrafiltriert (2 h bei 4 °C bei 1.000 g) mit einer Ausschlußgröße von 100.000 [Da] (Ultrafiltrationseinheit Microcon, Fa. Amicon). Vorher wurde getestet, ob das Ambruticin an der Filtermembran adsorbiert, indem Minimalmedium mit 10  $\mu$ g/ml Ambruticin durch die Filter geschickt wurde und die Ambruticin-Konzentration des Filtrates per MHK-Bestimmung im Vergleich zu unfiltriertem Minimalmedium ermittelt wurde. Dafür wurde das Medium in Mikrotiterplatten in 1:2-Schritten mit Minimalmedium mit  $10^6$  Zellen/ml verdünnt.

### 2.4.6 Protoplasten

Es wurden von *H. anomala* und *H. anomala* R<sup>Amb</sup> Protoplasten, die erleichtert Stoffe aufnehmen, hergestellt, um zu erkennen, ob für Ambruticin eine Aufnahmeresistenz besteht.

Tris-Puffer II: 0,1 M Tris-SO<sub>4</sub>, 10 mM EDTA, pH 9,3 (sterilfiltriert)

Sorbit-Puffer: 1 M Sorbit, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4 (sterilfiltriert)

Lyticase: 0,2 mg/ml in Sorbit-Puffer (Fa. Sigma)

Waschlösung: 0,8 M Sorbit, 20 mM PIPES, pH 6,5 (sterilfiltriert)

Übernachtskulturen von *H. anomala* bzw. *H. anomala* R<sup>Amb</sup> wurden in etwa 40 ml Minimalmedium in einem 100-ml-Erlenmeyerkolben mit schwefelhaltigen Aminosäuren (3 g/l Cystein und 0,5 g/l Methionin) 14–18 h bei 30 °C und 160 U/min auf einem Rundschüttler angezogen. Die Zellen wurden geerntet, das Pellet in 10 ml Tris-Puffer II und 10 µl β-Mercaptoethanol aufgenommen und zur Lockerung der Zellwand 30 min bei 30 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit Tris-Puffer II gewaschen, in 10 ml Sorbit-Puffer aufgenommen und mit 0,1 ml Lyticase für 60 – 90 min bei 30 °C behandelt. Zur Kontrolle der Protoplastenbildung wurden die Zellen mikroskopiert (Protoplasten sind rund, normale Zellen hingegen oval), waren keine normalen Zellen mehr zu erkennen, wurden die Ansätze zweimal mit Waschlösung gewaschen (Zentrifugation für 3 min bei 1.000 g) [17; 44].

50 µl *H. anomala* bzw. 100 µl *H. anomala* R<sup>Amb</sup> Protoplasten wurden in verschiedene, Protoplasten stabilisierende Medien gegeben: a) 5 ml Minimalmedium mit 1 M Sorbit; b) Minimalmedium mit 0,45 M Mannit; c) Minimalmedium mit 0,17 M Mannit; d) Malzextrakt-Medium mit 0,45 M Mannit. Die MHK-Bestimmung erfolgte nach der Standardmethode.

## 2.4.7 Liposomen

Hier sollte untersucht werden, ob die Resistenz von tierischen Zelllinien eine Aufnahme-resistenz ist oder ob Ambruticin spezifisch nur den Pilzstoffwechsel beeinflusst. Um eine Aufnahme von Ambruticin sicherzustellen, wurden Liposomen hergestellt, in denen Ambruticin eingeschlossen war. Sollte es sich bei den tierischen Zelllinien um eine Aufnahme-resistenz handeln, könnten nach erfolgreicher Gabe Ambruticin-haltiger Liposomen, z.B. über Fluoreszenzfärbetechnik der Wirkort eingegrenzt werden.

### 2.4.7.1 Allgemeines

Zur Herstellung von Liposomen mit ungesättigten Fettsäuren können α-Tocopherol oder Butylhydroxyanisol als lipophile, Ascorbinsäure als hydrophile Antioxidantien eingesetzt werden. EDTA dient als Fe-Komplexierer (Eisen katalysiert eine Lipidperoxidation). Ferner sollte unter N<sub>2</sub>-Schutzgas und möglichst kühl und dunkel gearbeitet werden. Werden 20 mol% Cholesterin eingesetzt, wird die Permeabilität gesenkt und die Stabilität der Liposomen erhöht. Phosphatidylserin verhindert wegen der negativen Ladung eine Aggregation [47].

Problematisch blieb die Größenbestimmung der gebildeten Liposomen sowie die Bestimmung des Ambruticin-Gehaltes in den Liposomen.

### 2.4.7.2 Synthese

Tris-Puffer III: 10 mM Tris, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,0 (steril)

Die Herstellung der Liposomen erfolgte in Anlehnung an Lichtenberg und Barenholz [47]: 4 mg Phosphatidylglycerin-distearyl, 4 mg Phosphatidylcholin-distearyl und 2 mg Cholesterin

wurden in einem sterilen 25 ml Spitzkolben mit 0,5 g Glasperlen ( $\varnothing = 0,5$  mm) in 2 ml Diisopropylether gelöst. Dazu wurden 0,45 ml Tris-Puffer III mit 50  $\mu$ l a) Ambruticin (1.000  $\mu$ g/ml in Methanol) oder b) Methanol oder c) Propidiumjodid (100  $\mu$ g/ml) gegeben. Unter leichtem Erwärmen wurde alles gelöst, dann stark gemixt (Vortex), 30 min bei 4 °C quellen gelassen und anschließend 2 min im Ultraschallbad behandelt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer vollständig abgezogen, die verbliebene wäßrige Phase wurde für 30 min bei 4 °C bei 10.000 g zentrifugiert, so daß im Überstand die sog. kleinen unilaminaren Vesikel verblieben. Die Liposomensuspension wurden weiter in 1:10 Schritten mit Tris-Puffer III verdünnt; die theoretische Ambruticin-Konzentration der unverdünnten Liposomensuspension betrug 1 mg/ml.

Zu 150  $\mu$ l Minimalmedium + 0,45 M Mannit mit Protoplasten (vgl. 2.4.6) von *H. anomala* bzw. *H. anomala* R<sup>Amb</sup> wurden 15  $\mu$ l Liposomensuspension gegeben und das Wachstum nach zwei Tagen bei 30 °C als OD<sub>620</sub> bestimmt. Die Propidiumjodid-Färbung wurde (qualitativ) mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops bestimmt. Ferner wurde bei allen Ansätzen die MHK nach der Standardmethode bestimmt.

In einem weiteren Versuch wurden Liposomen (ohne Propidiumjodid; die zugegebene Ambruticin-Lösung enthielt nur 100  $\mu$ g/ml) hergestellt - im Unterschied zur oben beschriebenen Präparation wurden dieser Ansatz 1 h bei 30.000 g zum Erhalt der kleinen unilaminaren Vesikel zentrifugiert.

Zu 150  $\mu$ l DME mit L929 Mauszellen wurden 15  $\mu$ l unverdünnte ( $\hat{=}$  theoretisch maximal 10  $\mu$ g/ml im Ansatz) sowie 1:10 verdünnte Liposomensuspension gegeben. Nach Zugabe von 1,5  $\mu$ l WST-1 wurde 24 h später die Stoffwechselaktivität der Zellen als Änderung der Extinktion bei 450 nm gemessen. Zusätzlich wurden die Zellen mikroskopiert, um eventuelle Zellschäden zu erkennen.

## 2.4.8 Permeabilisierte Zellen

Die Zellwand bzw. Zellmembran sollten permeabilisiert werden, um die Zellen für das zugegebene Ambruticin empfänglicher zu machen. Die Permeabilisierung wurde auf drei verschiedenen Arten durchgeführt:

Zu 5 ml Minimalmedium mit 10<sup>6</sup> Zellen/ml *H. anomala* bzw. *H. anomala* R<sup>Amb</sup> wurden a) 50  $\mu$ l Lyticase (0,2 mg/ml; Fa. Sigma) oder b) 20  $\mu$ l Chloroform und 20  $\mu$ l 0,1 % (w/v) SDS-Lösung oder c) 50  $\mu$ l Toluol gegeben, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach das Ambruticin gemäß der Standardmethode zur MHK-Bestimmung zugegeben.

## 2.4.9 Stoffwechselaktivität

Es sollte untersucht werden, wie lange die Zellen nach Ambruticin-Zugabe noch stoffwechselaktiv sind. Die Stoffwechselaktivität wurde als Dehydrogenase-Aktivität gemessen,

wobei der Farbstoff WST-1, ein Tetrazoliumsalz, zu einem roten Formazan reduziert wird, welches ein Absorptionsmaximum bei 450 nm hat.

In einer Mikrotiterplatte wurden zu 150 µl Minimalmedium mit  $10^7$  Zellen/ml *H. anomala* 15 µl WST-1 gegeben. Der Ansatz wurde 60 min vorinkubiert (30 °C), danach wurden 18 µl Ambruticin-Lösung zugesetzt. Der Probenwert (OD<sub>450</sub>) wurde um die WST-1-Eigenextinktion (OD<sub>450</sub> von Minimalmedium mit WST-1 ohne Zellen) korrigiert.

## 2.5 Kreuzresistenz

Bei Ambruticin-resistenten Hefen hatten Gerth et al. eine Kreuzresistenz zu den Antibiotika Pyrrolnitrin und zu den Jerangoliden entdeckt [21]. Daraufhin wurde untersucht, ob diese Antibiotika synergistisch zueinander wirken.

In Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen mit  $10^6$  Zellen/ml in 136 µl Minimalmedium wurden zweimal 17 µl Antibiotikumlösung (Ambruticin VS-3, Jerangolid A bzw. Pyrrolnitrin) in verschiedenen Konzentrationen gegeben und das Wachstum nach Inkubation bei 30 °C für 24 h als OD<sub>620</sub> bestimmt.

Da für Pyrrolnitrin der Wirkmechanismus ebenfalls nicht bekannt war, wurden weitere Antibiotika mit bekannter Wirkung, auf Kreuzresistenz untersucht.

Die MHK-Bestimmung wurde in Mikrotiterplatten mit 135 µl Minimalmedium und  $10^6$  Zellen/ml (*H. anomala* bzw. *H. anomala* R<sup>Amb</sup>) durchgeführt, in Vertiefung 1 wurden 15 µl Antibiotikumlösung gegeben und anschließend in 1:2-Schritten verdünnt. Im Unterschied zur Standardmethode wurde das Wachstum erst nach drei Tagen als OD<sub>620</sub> gemessen. Die untersuchten Antibiotika sind in Tab. 6 aufgeführt.

Tab. 6: Auf Kreuzresistenzen zwischen *H. anomala* und *H. anomala* R<sup>Amb</sup> untersuchte Antibiotika sowie deren höchste untersuchte Konzentration

Konz. Antibiotikum in Vertiefung 1	untersuchte Antibiotika
100 µg/ml	5-Fluoruracil, Amphotericin B, Antimycin A, Benomyl, Bleomycin <sup>1)</sup> , Bromuracil, Camptothecin, Chelidonin, Cycloheximid, Cytosin-9-β-D-Arabinofuranosid, Filipin, Fluoressigsäure, Griseofulvin, Metronidazol, Miconazol, N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin, Nystatin, Physostigmin, Soraphen
10 % (v/v)	Glycidol
200 µg/ml	Amethopterin, Kasugamycin
500 µg/ml	Melphalan, Mitomycin C
5.000 µg/ml	Hydroxyharnstoff

<sup>1)</sup> Bleomycin-Sulfat (Fa. Mack)

## 2.6 Energieladung

Die Energieladung des Adenylat-Systems reagiert sehr empfindlich auf Eingriffe in den Energiehaushalt - deshalb können damit schnelle Änderungen im Stoffwechsel aufgezeigt werden. Darum ist die Bestimmung der Energieladung aber auch stark von der Probenahme-technik beeinflusst, was den Nachweis sehr erschwert. Die Messung erfolgte in Anlehnung an Ball und Atkinson [5] und Holm-Hansen und Karl [30].

120 ml Minimalmedium in einem 1.000-ml-Erlenmeyerkolben mit  $6 \times 10^7$  Zellen/ml wurden für 1 h bei 30 °C und 160 U/min auf einem Rundschüttler vorinkubiert und anschließend wurden a) 1,2 ml Methanol (Kontrolle) und b) 1,2 ml 10 µg/ml methanolische Ambruticin-Lösung ( $\approx 0,1$  µg/ml im Ansatz) gegeben. Die Ansätze wurden bei 30 °C und 120 U/min weiterinkubiert. Zur Probennahme wurden 0,5 ml binnen 10 s entnommen, für 5 min in 0,5 ml siedenden Tris-Puffer gegeben und danach ins Eisbad gestellt. Die Zellen wurden anschließend mit 0,5 g Glasperlen ( $\varnothing = 0,5$  mm) im 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß für 3 min am Dismembrator bei 4 °C aufgeschlossen, die Glasperlen und Zelltrümmer abzentrifugiert (5 min, 8.000 g) und der Überstand bei -20 °C tiefgefroren. Sofort nach der Probenahme für die Bestimmung der Energieladung wurden 0,5 ml zur Zellzahlbestimmung entnommen und bei -20 °C tiefgefroren.

### 2.6.1 Adenylat-Bestimmung

Luciferase: Luciferase aus Glühwürmchen (1 mg/ml) E.C. 1.13.12.7 (Fa. Sigma)

Phosphat-Puffer I: 75 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 15 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,4

Phosphat-Puffer II: 20 ml Puffer I, 8 mg Pyruvat-Kinase (E.C. 2.7.1.40), 4,7 mg Phosphoenolpyruvat

Phosphat-Puffer III: 10 ml Puffer II und 5 mg Adenylat-Kinase (E.C. 2.7.4.3)

Glycylglycin-Puffer: 1,65 g Glycylglycin, 2,3 g  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  in 500 ml A. dest., pH 7,5 mit Na-Acetat eingestellt

ATP, ADP bzw. AMP-Stamm: jeweils 1 mM in Tris-Puffer

Der ATP-Gehalt kann direkt aus der Probe gemessen werden, zur ADP-Bestimmung wird dieses mit der Pyruvat-Kinase in ATP überführt und als solches bestimmt (abzüglich des ATP-Gehalts der Probe) und AMP wird zusätzlich mit der Adenylat-Kinase zu ADP umgewandelt (siehe Abb. 5). Da die Reaktionen aufeinander aufbauen, summieren sich auch mögliche Fehler.

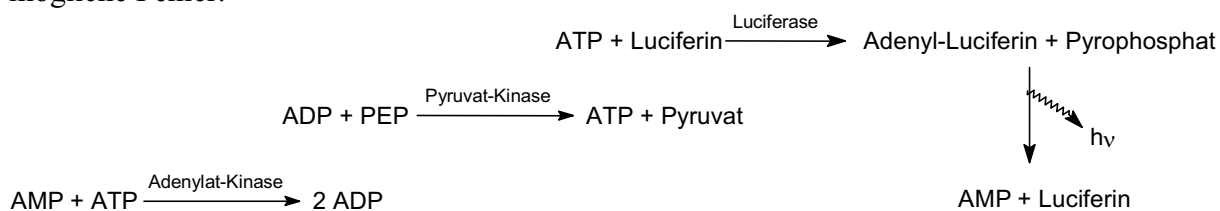


Abb. 5: Nachweis-Schema zur Adenylat-Bestimmung

### ATP-Bestimmung

200 µl Probe und 50 µl Phosphat-Puffer I wurden für 30 min bei 30 °C im Wasserbad erwärmt, anschließend für 2 min auf 95 °C erhitzt und danach im Eisbad abgekühlt. In ein staubfreies Gefäß wurden 200 µl Probe und 1 ml Glycylglycin-Puffer gegeben, dieses in das Lumineszenzmeßgerät gesetzt und die Messung durch Injektion von 100 µl Luciferase gestartet. Die Lumineszenz wurde über 60 s integriert, der Meßbereich lag zwischen 1 – 1.000 nM ATP.

ADP-Bestimmung: Analog zur ATP-Bestimmung, jedoch mit Phosphat-Puffer II. Die Integrationszeit wurde auf 30 s verkürzt, der Meßbereich lag zwischen 1 – 1.000 nM ATP.

AMP-Bestimmung: Analog zur ATP-Bestimmung, nur mit Phosphat-Puffer III. Die Integrationszeit wurde ebenfalls auf 30 s verkürzt, der Meßbereich lag zwischen 1 – 5.000 nM ATP.

## **2.7 DNA als Informationsmatrix**

### **2.7.1 Wechselwirkung mit DNA**

DNA-Stammlösung: 10 mg Lachs-DNA in 1 ml 0,01 M NaCl

DNA-Standardlösung: 100 µg/ml (DNA-Stammlösung 1 : 100 mit 0,01 M NaCl verdünnt)

DNA-Arbeitslösung: 25 µg/ml (DNA-Standardlösung 1 : 4 mit 0,01 M NaCl verdünnt)

Es sollte untersucht werden, ob Ambruticin an DNA adsorbiert oder damit interkaliert. Dafür wurden folgende UV-Spektren zwischen 200– 400 nm aufgenommen:

- a) DNA-Arbeitslösung,
- b) DNA-Arbeitslösung + 11 µg/ml Ambruticin bzw. 4 µg/ml Ethidiumbromid als Positivkontrolle,
- c) 11 µg/ml Ambruticin bzw. 4 µg/ml Ethidiumbromid,
- d) die Spektren von a) und c) wurden mathematisch addiert und mit b) verglichen.

### **2.7.2 DNA-Strangbrüche**

#### DNA-Isolierung

TE-Puffer: 0,01 M Tris, 0,05 M EDTA, pH 7,5

Lyticase (Fa. Sigma): 5 mg Lyticase (1.000 U/mg) in 100 µl Phosphat-Puffer, pH 7,5

LM-Agarose: 2 % low-melting-Agarose in 0,125 M EDTA unter Erwärmen lösen (pH 7,5), bei 42 °C flüssig gehalten

LET: 0,5 M EDTA, 0,01 M Tris, pH 7,5

NDS: 0,5 M EDTA, 0,01 M Tris (pH 7,5), 1 % N-Lauryl-sarcosin in 0,2 M Natronlauge (pH 9,5). Kurz vor Verwendung wurde Proteinkinase K mit Endkonzentration 5 mg/ml zugegeben.



Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an Kaiser et al. [35]: Aus Übernachtskulturen wurden je drei 25-ml-Kulturen von *H. anomala* bzw. *H. anomala* R<sup>Amb</sup> mit 10<sup>8</sup> Zellen/ml angesetzt und nach 1 h Vorinkubation wurden a) Methanol als Kontrolle, b) 2 µg/ml Ambruticin als Probe und c) 10 µg/ml N-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin als Positivkontrolle zugegeben. Aus 1 ml Probe wurden die Zellen abzentrifugiert (1 min, 2.000 g), das Pellet zweimal mit TE-Puffer gewaschen und in 0,4 ml TE-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde 10 µl Lyticase und 0,4 ml LM-Agarose zugegeben und vorsichtig gemixt. Nach 5-minütigem Abkühlen im Eisbad wurden 0,7 ml LET-Puffer und 5 µl β-Mercaptoethanol zugegeben. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wurde der Überstand verworfen, und mit 0,7 ml NDS-Puffer über Nacht bei 50 °C inkubiert. Nachdem viermal mit 0,7 ml TE-Puffer für je mindestens 1 h gewaschen wurde, wurden aus den Agaroseblöcken dünne Scheiben geschnitten und in die Taschen des Elektrophoresegels überführt.

#### Wechselfeld-Gelelektrophorese

TBE-Stammlösung (10 ×): 54 g Tris, 27,5 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 4,65 g Na<sub>2</sub>EDTA in 0,5 l A. dest., pH 8,3  
0,5 × TBE: 1 : 20-Verdünnung der TBE-Stammlösung

Für das 1%ige Agarosegel wurden 1,5 g Agarose in 150 ml 0,5 × TBE gelöst und anschließend bei 60 °C bis zum Gießen des Gels temperiert.

In die Elektrophoresekammer wurde 0,5 × TBE-Puffer gegeben und mit 1 l/min umgewälzt, wobei der Puffer auf 14 °C temperiert wurde.

Einstellungen an der Wechselfeld-Gelelektrophorese: 200 V, Wechselzeit: 60 s für 15 h, anschließend 90 s für 9 h.

Das Gel wurde für 30 min mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt und überschüssiges Ethidiumbromid mit A. dest. abgespült, so daß die aufgetrennte DNA im UV-Licht sichtbar wurde.

## **2.8 Vorversuche zur Synthese von <sup>14</sup>C-Ambruticin**

Es war vorgesehen, mit <sup>14</sup>C-markiertem Ambruticin eventuelle Veränderungen desselben in den Zellen (z. B. Aktivmetabolisierung) oder die Zielorganelle in der Zelle zu erkennen. Dafür sollte Ambruticin VS-4 mit <sup>14</sup>C-Methyljodid sukzessiv an der Aminogruppe zu Ambruticin VS-3 bzw. VS-1 methyliert werden. Die Methylierung der Aminogruppe des Ambruticins ist eine elektrophile Substitution, vermutlich nach dem S<sub>N</sub>2-Mechanismus. Damit das Methyljodid nicht ohne zu reagieren aus dem Gleichgewicht verschwindet, muß die Gasphase über dem Ansatz möglichst gering gehalten werden. Ferner können die Amine mit dem freigesetzten Jodid Salze bilden und sich so einer weiteren Methylierung entziehen. Um dem entgegenzuwirken, wird üblicherweise eine Hünig-Base zugegeben. Darauf wurde hier jedoch

verzichtet, um eine spätere Aufreinigung nicht zu erschweren. In Vorversuchen wurden die Reaktionsbedingungen optimiert. Folgendes Schema zeigt die Reaktion (Abb. 6):

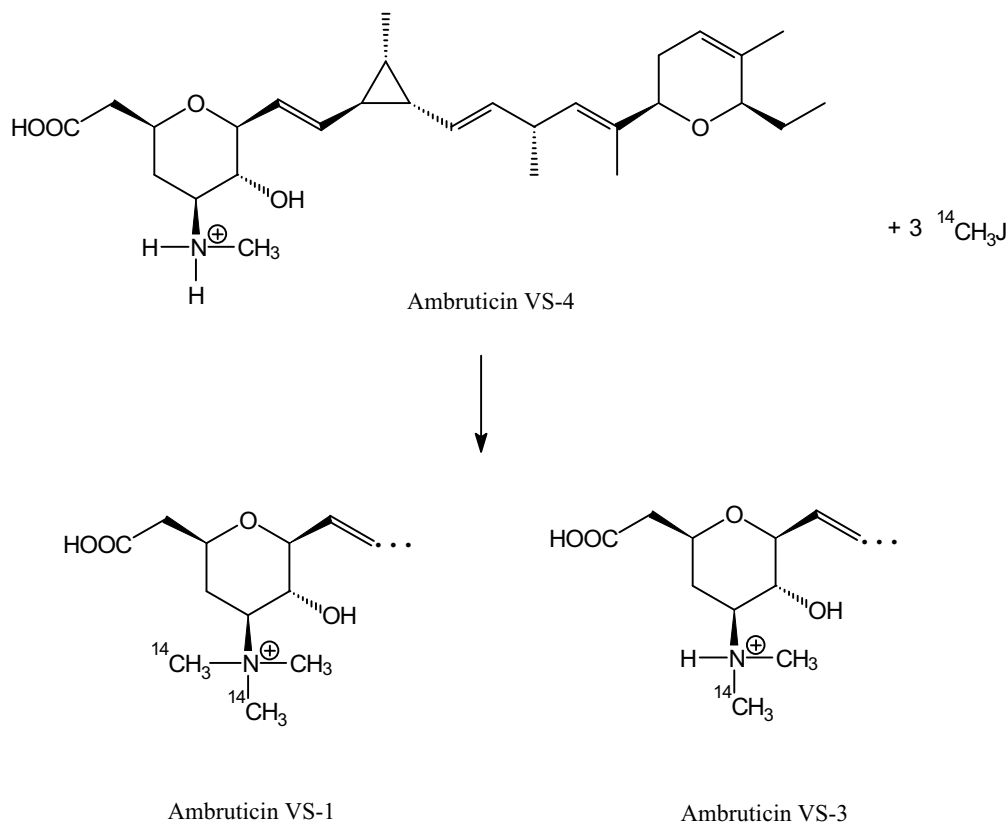


Abb. 6: Reaktionsschema zur Methylierung von Ambruticin VS-4 zu Ambruticin VS-1 und VS-3

### 2.8.1 Unterschiedliche Konzentrationsverhältnisse

Stammlösungen:

Methyljodid: 10  $\mu$ l CH<sub>3</sub>I in 1 ml Ethanol (22,8 mg/ml = 0,16 M) als Methylierungsmittel

Ambruticin VS-4: 10 mg Ambruticin VS-4 in 1 ml Ethanol (10 mg/ml = 0,02 M) als Edukt

Zu 100–200  $\mu$ l Methyljodid wurden in einem 300- $\mu$ l-HPLC-Gefäß entsprechend 100–200  $\mu$ l Ambruticin-VS-4-Lösung gegeben, das Gefäß verschlossen und für 1 h bzw. 3 h bei 60 °C erwärmt (Tab. 7). Nach der Reaktionszeit wurden die Ansätze bei -20 °C bis zur Analytik gelagert.

Tab. 7: Reaktionsansätze zur Ambruticin VS-1 Synthese mit unterschiedlichen Konzentrationsverhältnissen

Nr.	CH <sub>3</sub> I [ $\mu$ l]	Amb [ $\mu$ l]	CH <sub>3</sub> I [mmol/Ansatz]	Amb [mmol/Ansatz]	Verhältnis
a)	150	150	0,024	0,003	8 : 1
b)	100	200	0,016	0,004	4 : 1
c)	200	100	0,032	0,002	16 : 1

### 2.8.2 Unterschiedliche Reaktionszeit

Zu 80 µl Methyljodid wurden in einem 300-µl-HPLC-Gefäß 220 µl Ambruticin-VS-4-Lösung gegeben, das Gefäß verschlossen und für 1; 3; 6; 24 und 48 h auf 60 °C erwärmt (Tab. 8). Nach der Reaktionszeit wurden die Ansätze bei -20 °C bis zur Analytik gelagert.

Tab. 8: Reaktionsansatz zur Ambruticin VS-1 Synthese mit unterschiedlicher Reaktionszeit

Nr.	CH <sub>3</sub> J [µl]	Amb [µl]	CH <sub>3</sub> J [mmol/Ansatz]	Amb [mmol/Ansatz]	Verhältnis
d)	80	220	0,0128	0,0044	2,91 : 1

### 2.8.3 Unterschiedliche Lösungsmittel

Neben Ethanol wurden Methanol und Isopropanol als Lösungsmittel getestet, um die Nebenreaktion an der Hydroxylgruppe des Alkohols zu verringern. Dazu wurden folgende weitere Stammlösungen angesetzt:

Methyljodid: 10 µl CH<sub>3</sub>J in 1 ml Methanol als Methylierungsmittel.

Ambruticin VS-4: 5 mg Ambruticin VS-4 in 0,5 ml Methanol als Edukt

Methyljodid: 10 µl CH<sub>3</sub>J in 1 ml Isopropanol als Methylierungsmittel

Ambruticin VS-4: 5 mg Ambruticin VS-4 in 0,5 ml Isopropanol als Edukt

Das Ambruticin löste sich in der Reihe Methanol, Ethanol, Isopropanol zunehmend schwerer.

Zu 80 µl Methyljodid wurden in einem 300-µl-HPLC-Gefäß 220 µl Ambruticin-VS-4-Lösung gegeben, das Gefäß verschlossen und für 6 bzw. 24 h auf 60 °C erwärmt (Tab. 9). Nach der Reaktionszeit wurden die Ansätze bei -20 °C bis zur Analytik gelagert. Ferner wurde Methyljodid mit dem Lösungsmittel (Methanol und Isopropanol) umgesetzt, um die Toxizität der Nebenprodukte auf *H. anomala* zu untersuchen (Tab. 9).

Tab. 9: Reaktionsansätze zur Ambruticin VS-1 Synthese mit unterschiedlichen Lösungsmitteln (LM) sowie zur Herstellung der Nebenprodukte der Reaktion

Nr.	CH <sub>3</sub> J [µl]	Amb [µl]	CH <sub>3</sub> J [mmol/Ansatz]	Amb [mmol/Ansatz]	Verhältnis
d)	80	220	0,0128	0,0044	2,91 : 1
e)	80	220 (LM)		--	

### 2.8.4 Unterschiedliche Konzentrationsverhältnisse II

Methyljodid: 12,5 µl CH<sub>3</sub>J in 10 ml Isopropanol (0,02 M) als Methylierungsmittel

Zu 50 – 200 µl Methyljodid wurden in einem 300-µl-HPLC-Gefäß 100 µl Ambruticin-VS-4-Lösung und entsprechend bis 150 µl Isopropanol als Lösungsmittel gegeben, das Gefäß verschlossen und für 24 h auf 60 °C erwärmt (Tab. 10). Nach der Reaktionszeit wurden die Ansätze bei -20 °C bis zur Analytik gelagert.

Tab. 10: Unterschiedliche Konzentrationsverhältnisse bei Reaktionsansätzen zur Ambruticin VS-1 Synthese

Nr.	CH <sub>3</sub> J [ $\mu$ l]	Amb [ $\mu$ l]	Isopropanol [ $\mu$ l]	CH <sub>3</sub> J [mmol/Ansatz]	Amb [mmol/Ansatz]	Verhältnis
f)	200	100	0	0,004	0,002	2 : 1
g)	100	100	100	0,002	0,002	1 : 1
h)	50	100	150	0,001	0,002	1 : 2

### 2.8.5 Nachweis der Ambruticine

Sprühreagenz Vanillin-Schwefelsäure: 0,5 g Vanillin in 100 ml konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Ethanol (8 : 2, v/v)

Proben und Standards wurden auf eine DC Kieselgel 60 Fertigplatte (F<sub>254</sub>) aufgetüpfelt und mit 2 % (v/v) Eisessig in Methanol entwickelt (Tab. 11). Die Ambruticine haben einen schwachen Chromophor bei 254 nm und wurden zusätzlich durch Besprühen mit Vanillin-Schwefelsäure sichtbar gemacht (zum Teil war ein Erwärmen der besprühten DC-Platte notwendig). Die Methode wurde bei Höfle et al. [28] beschrieben.

Tab. 11: R<sub>f</sub>-Werte für die Ambruticine VS-1 – VS-5

Reihenfolge der Banden	Aminogruppe	R <sub>f</sub> -Werte
Abbauprodukte vom Amb		> 0,9
Ambruticin VS-5	-N <sup>+</sup> H <sub>3</sub>	0,70
Ambruticin VS-4	-N <sup>+</sup> H <sub>2</sub> (CH <sub>3</sub> )	0,51
Ambruticin VS-3	-N <sup>+</sup> H(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,32
Ambruticin VS-1	-N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	0,15

### 2.8.6 Toxizitätstest

Die MHK-Bestimmung wurde in Mikrotiterplatten mit 150  $\mu$ l Minimalmedium und 10<sup>6</sup> Zellen/ml (*H. anomala*) durchgeführt; von Vertiefung 1 ausgehend wurden die Ansätze in 1 : 2-Schritten verdünnt (Tab. 12). Nach Standardinkubation wurde das Wachstum als OD<sub>620</sub> gemessen.

Tab. 12: Füllschema für den Toxizitätstest (umgesetztes Lösungsmittel) sowie die MHK-Bestimmung mit umgesetztem Ambruticin und die Kontrolle mit der Ambruticin-Stammlösung

Lösungs- mittel	Ambruticin VS-4 Stammlösung	umgesetztes Ambruticin	umgesetztes Lösungs- mittel (Nebenprodukte)
Methanol	Vertiefung 1 : 10 $\mu$ g/ml	Vertiefung 1 : 1 $\mu$ g/ml	Vertiefung 1 : 5 % (v/v)
Ethanol	Vertiefung 1 : 10 $\mu$ g/ml	Vertiefung 1 : 1 $\mu$ g/ml	--
Isopropanol	Vertiefung 1 : 10 $\mu$ g/ml	Vertiefung 1 : 1 $\mu$ g/ml	Vertiefung 1 : 5 % (v/v)

Um die Radioaktivität des markierten Ambruticins von den markierten Nebenprodukten sowie dem nicht umgesetzten Methyljodid unterscheiden zu können, wäre eine Aufreinigung notwendig gewesen:

- Reaktionsansatz mit flüssigem N<sub>2</sub> tieffrieren, so daß das Methyljodid nicht flüchtig ist
- Destillationsapparatur evakuieren – Reaktionsansatz gekühlt halten
- Reaktionsansatz vorsichtig auftauen, um einen Siedeverzug zu verhindern (-32 °C)
- weiteres evakuieren ist nicht möglich, da sonst markiertes Methyljodid entweichen würde
- Vorlage mit flüssigem N<sub>2</sub> kühlen, um gasförmiges Methyljodid auszufrieren
- System begasen, in der Vorlage ist reines (markiertes) Methyljodid
- Trennung der Ambruticine per Dünnschichtchromatographie und Auswertung mit einem Scanner

## 2.9 Biosynthesen mit <sup>14</sup>C-Präkursoren

Mit dem Einbau von <sup>14</sup>C-markierten Präkursoren in die Biomasse sollte untersucht werden, ob und welche Biosynthesen durch Ambruticin inhibiert werden, um einen Anhaltspunkt für den primären Wirkmechanismus zu bekommen.

Trichloressigsäure (10% w/v): 20 g TCA in 200 ml A. dest.

Perchlorsäure (25% v/v): 50 ml HClO<sub>4</sub> (70%, ρ = 1,67) + 150 ml A. dest.

Salzsäure (0,01 M): 500 µl HCl (37%ig) in 500 ml A. dest.

Natronlauge (2 M): 40 g NaOH in 0,5 l A. dest.

Die Biosynthesen mit markierten Präkursoren wurden prinzipiell nach folgendem Schema durchgeführt: *H. anomala* aus einer Übernachtskultur wurde mit 10<sup>7</sup> Zellen/ml in 20 ml Minimalmedium in einem 100-ml-Erlenmeyerkolben für 1 h auf einem Rundschüttler (30 °C, 130 U/min) inkubiert. Der Versuch wurde gestartet, indem zum Ansatz der entsprechende nicht-markierte Präkursor und der gewünschte markierte Präkursor (0,1 – 0,15 µCi/ml) zugegeben wurde. Nach 40 – 120 min Wachstum wurden 1% (v/v) Antibiotikumlösung zugegeben; Methanol (1:10 mit Tris-Puffer verdünnt) diente als Kontrolle und Ambruticin-Lösung (100 µg/ml, 1:10 mit Tris verdünnt) als Probe. Zur Probenahme wurden 500 µl aus dem Ansatz in 1 ml eiskalte TCA gegeben und über Nacht bei -20 °C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Proben unter Vakuum über Glasfaserfilter (Whatman GF/B) filtriert, dreimal mit 1 ml eiskalter TCA, mit 5 ml eiskalter Salzsäure und 5 ml eiskaltem A. dest. gespült. Der Filter wurde ausgestochen, über Nacht getrocknet, 3 ml Szintillationscocktail (Typ Quicksafe A, Fa. Zinsser Analytic) zugegeben und die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen. Die Freigrenze für L1-Labore beträgt für <sup>14</sup>C markierte Isotope 10 µCi und für <sup>3</sup>H-Isotope 50 µCi (1 µCi <sup>14</sup>C ≅ 2 × 10<sup>6</sup> counts).

### 2.9.1 DNA-Synthese mit $^{14}\text{C}$ -Adenin

Für die DNA-Synthese betrug die Ansatzgröße 25 statt 20 ml. Zugegeben wurden 10 mM nicht-markierte Nucleotide (Ade, Cyt, Gua, Thy) und 0,15  $\mu\text{Ci/ml}$  8- $^{14}\text{C}$ -Adenin (54,7 mCi/mmol). Die Probe wurde nun nicht in TCA, sondern in 0,5 ml Natronlauge zur Hydrolyse der RNA gegeben und über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen. Zu den Proben wurden dann 1 ml eiskalte Perchlorsäure gegeben und für mindestens 30 min im Eisbad die DNA ausgefällt. Anschließend wurden die Proben unter Vakuum über Glasfaserfilter filtriert und standardgemäß weiterbehandelt.

### 2.9.2 Nucleinsäuresynthese mit $^{14}\text{C}$ -Adenin

Die Nucleinsäuresynthese (RNA und DNA) wurde aus demselben Ansatz wie die DNA-Synthese (siehe 2.9.1) bestimmt, die Proben wurden aber nicht alkalisch hydrolysiert, sondern standardgemäß direkt in TCA gegeben.

### 2.9.3 RNA-Synthese mit $^{14}\text{C}$ -Uracil

Der Versuch wurde mit 10 mM nicht-markierten Nucleotiden (Ade, Cyt, Gua, Ura) und 0,10  $\mu\text{Ci/ml}$  2- $^{14}\text{C}$ -Uracil (60,0 mCi/mmol) gestartet. Die weitere Probenbehandlung erfolgte standardgemäß.

### 2.9.4 Proteinsynthese mit $^{14}\text{C}$ -Leucin

Der Versuch wurde mit 2 mg/ml nicht-markiertem L-Leucin und 0,15  $\mu\text{Ci/ml}$  U- $^{14}\text{C}$ -Leucin (310,8 mCi/mmol) gestartet, als Positivkontrolle diente ein Ansatz mit 1,0  $\mu\text{g/ml}$  Cycloheximid. Die weitere Probenbehandlung erfolgte standardgemäß.

### 2.9.5 Lipidsynthese mit $^{14}\text{C}$ -Acetat

Der Versuch wurde mit 5 mg/ml nicht-markiertem Na-Acetat und 0,15  $\mu\text{Ci/ml}$  2- $^{14}\text{C}$ -Acetat (55 mCi/mmol) gestartet. Die weitere Probenbehandlung erfolgte standardgemäß.

Dieser Versuch wurde auch mit Zugabe von 0,1  $\mu\text{g/ml}$  Ambruticin und 0,5 mg/ml nicht-markiertem Na-Acetat durchgeführt. Dieser Ansatz wurde bilanziert, um zu sehen, auf welche Fraktionen sich die Radioaktivität verteilte: Erfasst wurde die Gesamtradioaktivität im Ansatz nach 4 h Inkubationszeit mit Ambruticin und die Radioaktivität im Überstand, nachdem die Zellen abzentrifugiert worden waren. Die Differenz, also die in die Zellen eingebaute Aktivität, wurde berechnet. Die Zellen wurden in Chloroform/Methanol 2:1 aufgenommen und der Zellextrakt wurde dreimal mit wässrigen Lösungen gewaschen (siehe 2.11). Die Radioaktivität wurde aus jeder Waschlösung sowie dem gewaschenen Extraktionsmittel bestimmt.

### 2.9.6 Polymersynthesen mit $^{14}\text{C}$ -Glycerin

Der Versuch wurde mit 1  $\mu\text{l/ml}$  nicht-markiertem Glycerin (85%ig) und 0,1  $\mu\text{Ci/ml}$  U- $^{14}\text{C}$ -Glycerin (171 mCi/mmol) gestartet. Die Probenbehandlung erfolgte standardgemäß.

### 2.9.7 Lipidsynthese mit $^3\text{H}$ -Inosit

KOH (0,2 M): 2,8 g KOH gelöst in 250 ml Methanol/Toluol (1 : 1)

Die Ansatzgröße betrug 25 statt 20 ml, zugegeben wurden 10  $\mu\text{g/ml}$  nicht-markiertes Inosit und 0,8  $\mu\text{Ci/ml}$  2-(N)- $^3\text{H}$ -Inosit (23 Ci/mmol). Eine entnommene Probe wurde mit 0,5 ml TCA behandelt und über Nacht bei  $-20^\circ\text{C}$  tiefgefroren (Ausfällung der Inosit-Phospholipide und Inosit-Sphingolipide). Die weitere Probenbehandlung erfolgte standardgemäß. Bei der zweiten Probe wurden über Nacht mit 0,5 ml KOH die Phospholipide hydrolysiert und die verbliebenen  $^3\text{H}$ -Inosit-Sphingolipide mit 1 ml Perchlorsäure ausgefällt. Nach dem Filtrieren unter Vakuum über Glasfaserfilter (Whatman GF/B) wurden die Proben dreimal mit 1 ml TCA, 4 ml eiskaltem Methanol und schließlich mit etwas eiskaltem A. dest. gewaschen. Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte standardgemäß. Die Methode wurde variiert nach Oh et al. [50].

### 2.9.8 Einfluß auf Synthesen mit 3- $^{14}\text{C}$ -Pyruvat

Der Versuch wurde mit 1 mg/ml nicht-markiertem Na-Pyruvat und 0,1  $\mu\text{Ci/ml}$  3- $^{14}\text{C}$ -Pyruvat (18,4 mCi/mmol) gestartet. Die weitere Probenbehandlung erfolgte standardgemäß.

### 2.9.9 Polymersynthese und $\text{CO}_2$ -Freisetzung aus U- $^{14}\text{C}$ -Glucose

Die Polymersynthese wurde mit 0,15  $\mu\text{Ci/ml}$  U- $^{14}\text{C}$ -Glucose (293 mCi/mmol) gestartet. Die Probenbehandlung erfolgte standardgemäß.

Der Versuch zur  $\text{CO}_2$ -Freisetzung wurde in einem 50-ml-Erlenmeyerkolben mit Schraubverschluß und zentralem Behältnis für 1,5 ml  $\text{CO}_2$ -Absorptionslösung (2-Methoxyethanol/Ethanolamin 2:1, v/v) durchgeführt. Als Medium diente Minimalmedium mit 5 statt 10 g/l Glucose, geschüttelt wurde mit 70 statt 130 U/min. Gestartet wurde der Versuch durch Zugabe von 0,10  $\mu\text{Ci/ml}$  U- $^{14}\text{C}$ -Glucose (12,1 mCi/mmol), als Probe wurden 50  $\mu\text{l}$   $\text{CO}_2$ -Absorptionslösung direkt in 3 ml Szintillationscocktail gegeben.

### 2.9.10 Zellwandsynthese und Glycoproteine mit $^{14}\text{C}$ -Mannose

Der Versuch wurde mit 0,05 mg/ml nicht-markierter Mannose, 0,01 mg/ml  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 0,1  $\mu\text{Ci/ml}$  1- $^{14}\text{C}$ -Mannose (0,3 mCi/mmol) gestartet. Die weitere Probenbehandlung erfolgte standardgemäß.

### 2.9.11 Zellteilung mit $^{14}\text{C}$ -N-Acetylglucosamin

Der Versuch wurde mit 0,3 mg/ml nicht-markiertem N-Acetylglucosamin und 0,125  $\mu\text{Ci}$  1- $^{14}\text{C}$ -N-Acetylglucosamin (0,05 mCi/mmol) gestartet. Die weitere Probenbehandlung erfolgte standardgemäß.

### 2.9.12 Zellpermeabilität mit $^{14}\text{C}$ -Isoaminobutyrat

Zu einer 30 ml Kultur mit  $2 \times 10^7$  Zellen/ml in Minimalmedium wurden 5  $\mu\text{Ci}$  2-[1- $^{14}\text{C}$ ]-Isoaminobutyrat (11,7 mCi/mmol) gegeben und für 36 h bei 130 U/min inkubiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert, mit Tris-Puffer gewaschen und in 5 ml Tris-Puffer resuspendiert. 25 ml Minimalmedium bzw. Tris-Puffer wurden jeweils mit 1 ml Zellsuspension inokuliert und 2 h später Ambruticin bzw. Pyrrolnitrin in verschiedenen Konzentrationen sowie 30  $\mu\text{g/ml}$  Amphotericin B als Positivkontrolle zugegeben. Die Kultivierung bei 0 °C wurde im Eisbad mit 100 U/min durchgeführt. 500  $\mu\text{l}$  Probe wurde für 2 min bei 15.800 g zentrifugiert. Je 250  $\mu\text{l}$  Überstand wurden direkt in 3 ml Szintillationscocktail gegeben und die ins Medium abgegebene Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt.

## 2.10 Glycerin

Zellen von *H. anomala* bzw. *H. anomala* R<sup>Amb</sup> wurden in 200 ml Minimalmedium mit  $5 \times 10^7$  Zellen/ml in einem 500-ml-Erlenmeyerkolben 3 h lang vorinkubiert. Der Versuch wurde durch Zugabe von 0,1  $\mu\text{g/ml}$  Ambruticin gestartet (1,0  $\mu\text{g/ml}$  Ambruticin für *H. anomala* R<sup>Amb</sup>). Von 10 ml Probe wurden die Zellen abzentrifugiert (4.200 g), 1 ml des Überstands zur Medium-Analytik bei -20 °C tiefgefroren, das Pellet mit 5 ml A. dest. gewaschen, in 1 ml A. dest. resuspendiert und für 10 min auf 95 °C erhitzt. Die Proben wurden bei -20 °C bis zur Analyse tiefgefroren. Nach dem Auftauen wurden zu den Proben im 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß 1 g Glasperlen ( $\varnothing = 0,5$  mm) gegeben, die verbliebenen Zellen für 3 min am Dismembrator aufgeschlossen und die Bruckstücke für 10 min bei 15.800 g abzentrifugiert. Untersucht wurden dieser Überstand sowie das Medium.

### 2.10.1 Glycerin-Bestimmung mittels HPLC

Die Glycerinbestimmung erfolgte refraktometrisch nach Auftrennung der Substanzen mittels HPLC (Shodex sugar-column Ionpak KS-801, Fließgeschwindigkeit 0,75 ml/min, Laufmittel A. dest. bei 80 °C); dabei hatte Glycerin einen R<sub>F</sub>-Wert von 12,0 – 12,5 min. Die Methode wurde variiert nach van Eck et al. [15]. Die R<sub>F</sub>-Werte der eingesetzten Standards (2 g/l) gehen aus Abb. 7 hervor:



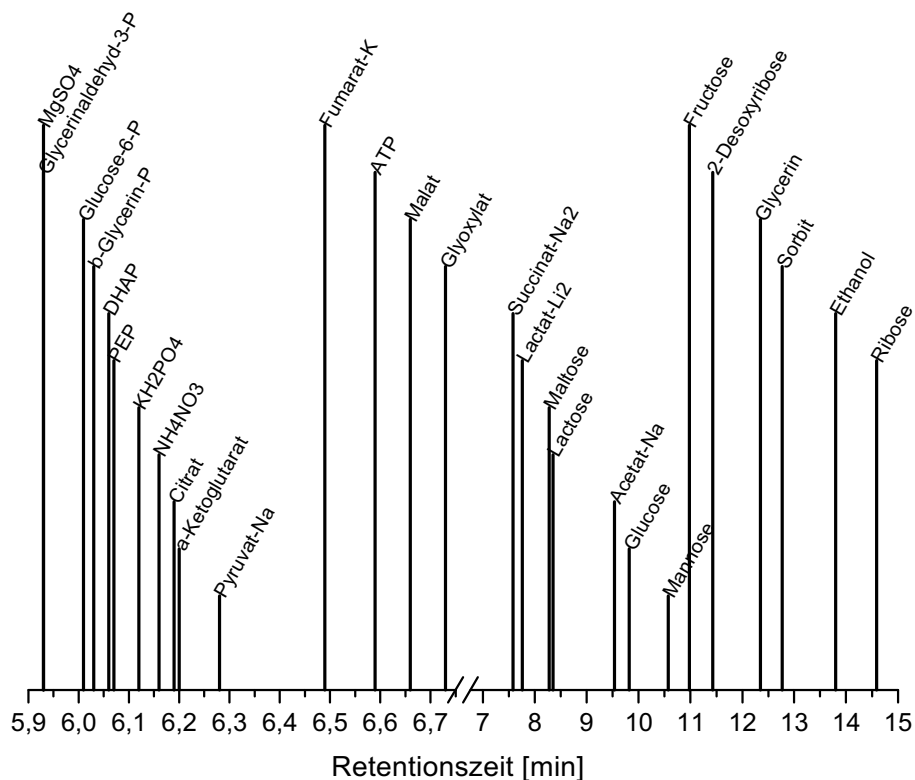


Abb. 7: Trennung verschiedener Zucker mittels HPLC (refraktometrische Detektion)

Für Glycerin und Glucose wurden mit Standardlösungen Kalibrierungskurven zwischen 1–100 mM aufgenommen (Abb. 8):

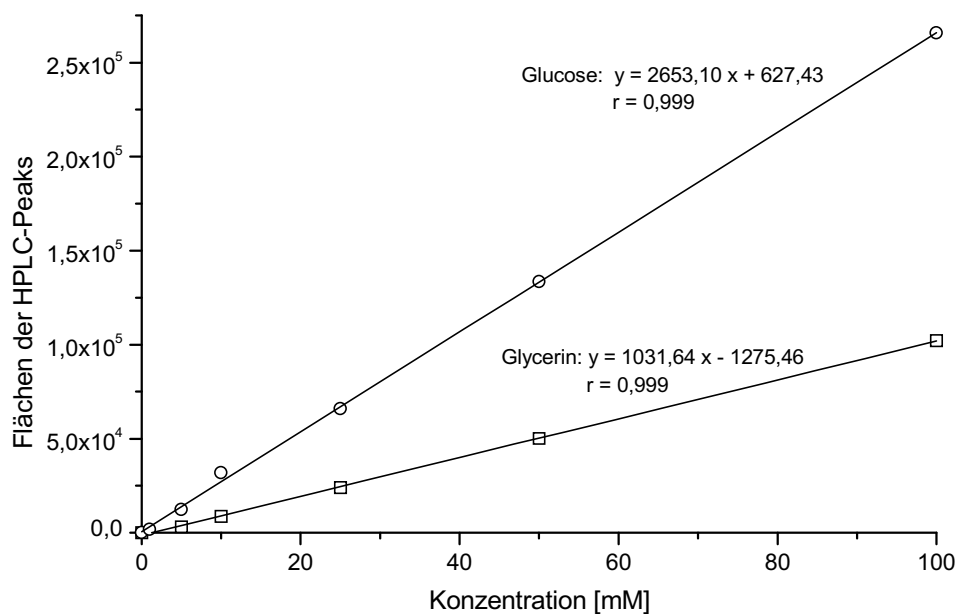


Abb. 8: Kalibrierungskurve zur Glucose und Glycerin-Bestimmung mittels HPLC

### 2.10.1.1 Aufstockungsexperiment

Die HPLC-Glycerinpeaks in den Proben konnten durch Zugabe von externem Glycerin ziemlich genau um den abgeschätzten Betrag erhöht werden, ohne daß ein Nebenpeak oder eine Schulter zu erkennen war (Tab. 13). Dieses ist ein weiterer Hinweis, daß es sich bei dem

Peak  $R_f \approx 12,3$  um Glycerin handelt. Dafür wurden zu 250  $\mu$ l Zellextrakt 50  $\mu$ l Glycerinlösung (100 mM) gegeben, so daß ein um 11.700 Einheiten vergrößerter Glycerinpeak erwartet wurde.

Tab. 13: Vergleich der HPLC-Peaks vom Zellextrakt nach Zugabe von extremem Glycerin mit dem erwarteten Wert

Antibiotikum [ $\mu$ g/ml] Probennahmezeit [min]	Kontrolle		0,1 Ambruticin		0,1 Pyrrolnitrin	
	-15	+30	-15	+30	-15	+30
HPLC-Peaks ohne externes Glycerin	2.870	1.160	2.680	7.940	2.400	5.100
gemessene HPLC-Peaks	14.849	11.472	13.743	17.672	12.675	14.813
erwartete HPLC-Peaks	14.570	12.860	14.380	19.640	14.100	16.800

### 2.10.2 Enzymatische Glycerin-Bestimmung

Die Glycerinbestimmung erfolgte mit der Glycerin-Dehydrogenase (EC 1.1.1.6), in Anlehnung an Schomburg und Stephan [63]:

715  $\mu$ l Puffer (100 mM Glycin-NaOH mit 100 mM NaCl, pH 10,5)

25  $\mu$ l NAD (40 mg/ml)

250  $\mu$ l Probe (Zellextrakt bzw. Standard)

10  $\mu$ l Enzym (1 U Glycerin-Dehydrogenase:  $\text{Glycerin} + \text{NAD} \rightarrow \text{Dihydroxyaceton} + \text{NADH}$ )

Gemessen wurde die Extinktionszunahme bei 340 nm. Folgende Substanzen störten den Enzymtest nicht: Glucose, Tris-Puffer, Ethanol, Sorbit,  $\beta$ -Glycerin-phosphat, Ambruticin, Glycerinaldehyd-3-phosphat, 2,3-Phosphoglycerat, Lactat; dafür störten jedoch folgende Stoffe: Pyruvat, Glyoxylat, Phosphoenolpyruvat, Dihydroxyacetonphosphat.

Für den Konzentrationsbereich von 0–1 mM Glycerin entsprach die Kalbrierungskurve einer linearen Regression; erst bei höheren Konzentrationen (1–5 mM) wurde die Kurve besser mit einer polynomischen Regression beschrieben.

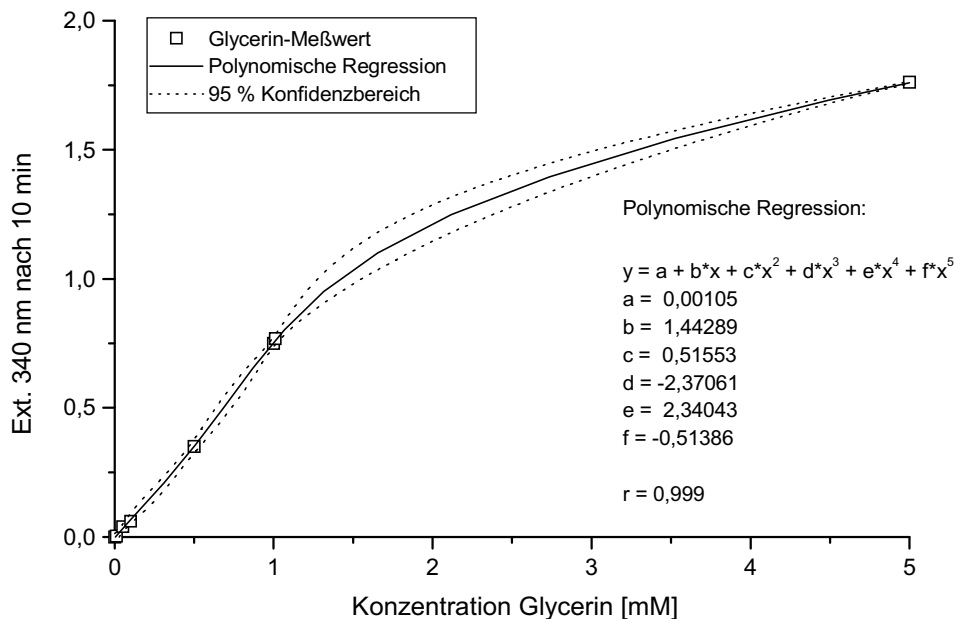


Abb. 9: Kalibrierungskurve zur enzymatischen Glycerin-Bestimmung (10 min Reaktionszeit). Linearität war bis 1 mM Glycerin gewährleistet

### 2.10.2.1 HPLC-Fraktionierung

Zur Verifizierung des HPLC-Glycerinpeaks wurde dieser aufgefangen und auf Umsetzung durch die Glycerin-Dehydrogenase hin untersucht:

Zu 100 µl Glycerinfraktion (aus dem HPLC-Lauf) wurden 100 µl Glycin-Puffer (100 mM Glycin-NaOH mit 100 mM NaCl, pH 10,5), 10 µl NAD<sup>+</sup> (40 mg/ml) und 5 µl Enzym (0,7 U) gegeben und die Extinktionsänderung bei 340 nm gemessen. Ein Ansatz ohne Enzym fungierte als Blindwert. In dem R<sub>f</sub>-Bereich um 12,3 min könnten sich nur Sorbit (12,8 min) oder Ethanol (13,8 min) befunden haben, die den Enzymtest aber nicht störten. Die den Enzymtest störende Stoffe liefen alle erheblich früher (6,0–7,0 min).

Tab. 14: Extinktionswerte (340 nm) für die mittels HPLC getrennten Glycerinfraktionen nach dem Glycerin-Dehydrogenase-Test (30 min Reaktionsdauer)

Antibiotikum [µg/ml]	Kontrolle		0,1 Ambruticin		0,1 Pyrrolnitrin		Glycerin 1 mM
Probennahmezeit [min]	- 15	+30	- 15	+30	- 15	+30	
Probenwert	0,519	0,496	0,518	0,580	0,522	0,556	0,674
Blindwert	0,303	0,288	0,302	0,311	0,308	0,308	0,289
Probe - Blindwert	0,216	0,208	0,216	0,253	0,214	0,248	0,385

Mit diesem Test konnte zusätzlich bestätigt werden, daß es sich bei der fraglichen Substanz um Glycerin handelte.

### 2.10.3 Glycerin-Nachweis mit $^{14}\text{C}$ -Glucose

Mit diesen Versuchen sollte nachgewiesen werden, ob das gebildete Glycerin über die Glycolyse aus Glucose neu synthetisiert wurde oder z.B. infolge von Lipase-Aktivität aus Triacylglyceriden oder Phospholipiden freigesetzt wurde. Um eine hohe Glucoseaufnahme zu gewährleisten, wurde ein Minimalmedium mit 4 statt 10 g/l Glucose bzw. das Glucose-freie Casamino acid-Medium verwendet. Die Kultivierung erfolgte mit  $5 \times 10^7$  Zellen/ml in 100 ml Medium in einem 250-ml-Erlenmeyerkolben. Die Kultur in Glucose-reduziertem Medium wurde 2 h mit 5  $\mu\text{Ci}$  U- $^{14}\text{C}$ -Glucose (12,1 mCi/mmol) vorinkubiert und der Versuch mit 0,1  $\mu\text{g/ml}$  Ambruticin gestartet. Die Kultur in Casamino acid-Medium wurde 2 h mit 2,5  $\mu\text{Ci}$  U- $^{14}\text{C}$ -Glucose vorinkubiert und danach mit 0,1  $\mu\text{g/ml}$  Ambruticin sowie 2,5  $\mu\text{Ci}$  U- $^{14}\text{C}$ -Glucose gestartet. Die Probennahme erfolgte wie unter 2.10 beschrieben. Für die Glycerinbestimmung wurden die Proben mittels HPLC getrennt (vgl. 2.10.1) und in 15 s Fraktionen ( $\approx 187,5 \mu\text{l}$ ) gesammelt. Davon wurden je 100  $\mu\text{l}$  in 2 ml Szintillationscocktail gegeben und die Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt.

Von folgenden  $^{14}\text{C}$ -markierten Substanzen wurden die  $R_f$ -Werte als Standard bestimmt: U- $^{14}\text{C}$ -Fructose-1,6-bisphosphat (330 mCi/mmol), U- $^{14}\text{C}$ -Glycerin-3-phosphat (71 mCi/mmol), 8- $^{14}\text{C}$ -ATP (52 mCi/mmol), 3- $^{14}\text{C}$ -Pyruvat (18,4 mCi/mmol), U- $^{14}\text{C}$ -Lactat (54 mCi/mmol), 1,4- $^{14}\text{C}$ -Succinat (60 mCi/mmol), U- $^{14}\text{C}$ -Glucose (12,1 mCi/mmol), 1- $^{14}\text{C}$ -Mannose (0,3 mCi/mmol) und U- $^{14}\text{C}$ -Glycerin (12,1 mCi/mmol). Von folgenden, nicht-markierten Substanzen wurden an derselben HPLC-Anlage mit einem Lichtstredetektor die  $R_f$ -Werte bestimmt: Glucose-6-phosphat, Glycerin-3-phosphat, Fructose-1,6-bisphosphat, Dihydroxyacetonphosphat, Glucose, Glycerin und Sorbit. Beide Ergebnisse sind in Abb. 10 vergleichend zusammengefaßt.

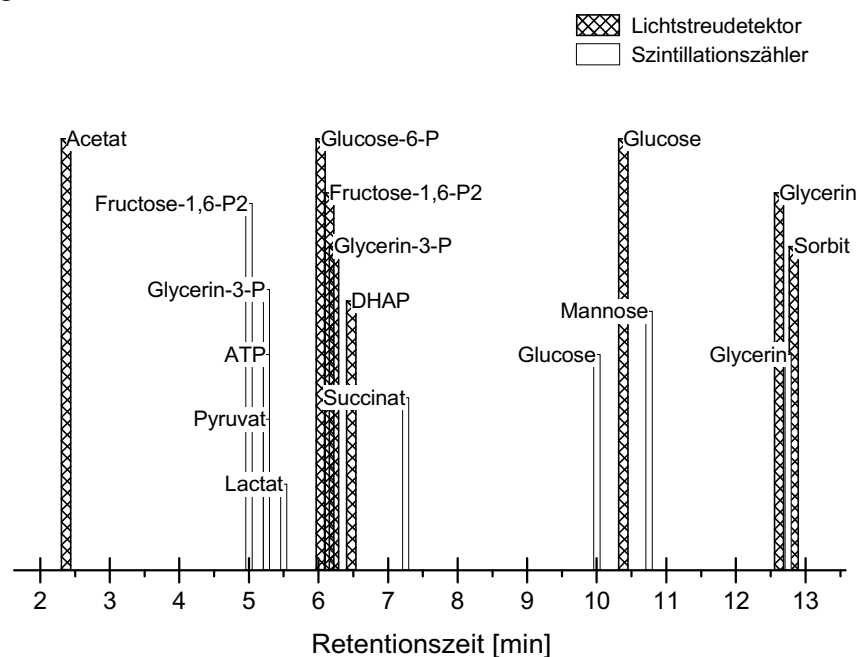


Abb. 10: Retentionszeiten von  $^{14}\text{C}$ -markierten (gemessen nach Fraktionierung im Szintillationszähler) und unmarkierten (gemessen per Lichtstredetektor) Standards

### 2.10.3.1 Glucoseaufnahme

Gleichzeitig wurde bei diesen Versuchen die Abnahme der Radioaktivität im Medium als Maß der Glucoseaufnahme bestimmt, indem zu 100 µl Medium 3 ml Szintillationscocktail gegeben und die Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt wurde.

## 2.11 Lipidmuster

Zur Untersuchung der Lipide wurden Zellen von *H. anomala* bzw. *H. anomala* R<sup>Amb</sup> in 100 ml Minimalmedium mit  $2 \times 10^7$  Zellen/ml im 500-ml-Erlenmeyerkolben 1 h lang vorinkubiert und 1 h mit 0,05 µCi/ml 2-<sup>14</sup>C-Acetat (55 mCi/mmol) weiterwachsen gelassen. Der Versuch wurde durch Zugabe von 0,1 µg/ml Ambruticin gestartet (1,0 µg/ml Ambruticin für *H. anomala* R<sup>Amb</sup>). Von 10 ml Probe wurden die Zellen abzentrifugiert (4.200 g). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 2,5 ml Methanol suspendiert und mit 2 ml Chloroform für 1 h die Lipide extrahiert (Raumtemperatur, 150 U/min). Durch Zugabe von 1 ml 1 M NaCl mit anschließender Zentrifugation (4.200 g) wurde eine Phasentrennung herbeigeführt. Die (untere) organische Phase wurde erst mit 3 ml Methanol/1 M NaCl (5:1, v/v) und anschließend mit 2,5 ml A. dest. gewaschen. Die gewaschene organische Phase wurde im N<sub>2</sub>-Strom bis zur Trockene eingengt und der Rückstand in 25–50 µl Chloroform aufgenommen. Die Lipidextraktion erfolgte in Anlehnung an Sato und Murata [61].

Zum Auftrennen der Lipide wurden 10 µl Lipidextrakt auf eine DC-Platte (HPTLC-Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 10×10 cm; Fa. Merck) aufgetragen und mit folgendem (apolaren) Laufmittel entwickelt: Heptan/Diethylether/Eisessig (70:30:1, v/v/v). Methode wurde variiert nach Pridzun [52]. Die R<sub>F</sub>-Werte sind in Tab. 15 zusammengefaßt. Ausgewertet wurde das entwickelte Lipidmuster

- durch Besprühen mit Rhodamin B 0,01 % (w/v) in Ethanol/1 M Natronlauge (1:1) und anschließender Auswertung im UV-Licht (254 nm) [70],
- indem die in die Lipide eingebaute Radioaktivität mit dem TLC-linear Analyzer Tracemaster quantifiziert wurde.

Tab. 15: R<sub>F</sub>-Werte für Referenzlipide für das Laufmittel Heptan/Diisopropylether/Eisessig (70:30:1, v/v/v)

Lipidklasse	Referenzlipide	R <sub>F</sub> -Wert
Phospholipide	PCss, PEss, PAss, PGss	0,00
Monoacylglyceride	1-Stearyl glycerid	0,03
Diacylglyceride	1,2-, 1,3-Distearyl glycerid	0,21
Sterine	Ergosterin, Cholesterin	0,22–0,23
freie Fettsäuren	Stearinsäure, Linolsäure	0,41–0,47
Triacylglyceride	Tristearyl glycerid	0,83
Squalen	Squalen	0,99

Die beobachteten  $^{14}\text{C}$ -Acetat-markierten Lipid-Peaks wurden einzeln chemisch charakterisiert.

### 2.11.1 Charakterisierung des Lipidextraktes

Damit genügend Material zur Untersuchung der Lipide zur Verfügung stand, wurden in einem weiteren Ansatz  $^{14}\text{C}$ -Acetat-markierte Lipide produziert. 3 Ansätze mit  $1 \times 10^8$  Zellen/ml von *H. anomala* wurden in 25 ml Minimalmedium für 2 h vorinkubiert und anschließend für 2 h mit jeweils 12,5  $\mu\text{Ci}$  2- $^{14}\text{C}$ -Acetat (55 mCi/mmol) und 0,25 mg/l unmarkiertem Na-Acetat weiterwachsen gelassen. 3 h nach Zugabe von 0,1  $\mu\text{g/ml}$  Ambruticin oder 0,1  $\mu\text{g/ml}$  Pyrrol-nitrin bzw. eines Aliquots Methanol als Kontrolle wurden die Ansätze geerntet. Die Zellen wurden abzentrifugiert (4.200 g), der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 4 ml Methanol suspendiert. Nach Zugabe von 4 ml Chloroform wurden die Lipide für 1 h extrahiert (Raumtemperatur, 150 U/min). Mit 2 ml 1 M NaCl und anschließender Zentrifugation (4.200 g) wurde eine Phasentrennung herbeigeführt. Die (untere) organische Phase wurde erst mit 5 ml Methanol/1 M NaCl (5:1, v/v) und anschließend mit 4 ml A. dest. gewaschen. Die organische Phase wurde im  $\text{N}_2$ -Strom bis zur Trockene eingengt und der Rückstand in 200  $\mu\text{l}$  Chloroform aufgenommen. 100  $\mu\text{l}$  Lipidextrakt wurden in 100  $\mu\text{l}$  Toluol überführt.

Die chromatographische Auftrennung der Lipide erfolgte, indem 20  $\mu\text{l}$  Lipidextrakt in Chloroform auf eine DC-Platte aufgetragen und mit dem apolaren Laufmittel Heptan/Diethylether/Eisessig (70:30:1, v/v/v) entwickelt wurden.

Als Kontrollen für die entsprechende Reaktion wurden die unmarkierten Lipide Tristearylglycerid, Stearinsäure und Lanosterin verwendet.

#### 2.11.1.1 Saure Umesterung

Zu 25  $\mu\text{l}$  Lipidextrakt in Toluol wurden 100  $\mu\text{l}$  Methanol und 10  $\mu\text{l}$  konz. Salzsäure gegeben und für 2 h auf 70 °C erwärmt. Nach dem Abkühlen wurden die Lipide mit 200  $\mu\text{l}$  Chloroform für 0,5 h reextrahiert. Zur Phasentrennung wurden 500  $\mu\text{l}$  1 M NaCl zugegeben. Die wäßrige Phase wurde verworfen und die organische Phase im  $\text{N}_2$ -Strom bis zur Trockene eingengt. Die Lipide wurden in 20  $\mu\text{l}$  Chloroform aufgenommen. Erwartet wurde, daß

- Triacylglyceride sauer zu Glycerin und Fettsäuren hydrolysiert werden und die Fettsäuren mit Methanol zu Fettsäuremethylestern umgeestert werden,
- freie Fettsäuren mit Methanol zu Fettsäuremethylestern verestert werden,
- Sterine mit ihrer freien Hydroxylgruppe nicht reagieren.

#### 2.11.1.2 Umsetzung mit Trifluoracetanhydrid

Zu 25  $\mu\text{l}$  Lipidextrakt in Toluol wurden 100  $\mu\text{l}$  Trifluoracetanhydrid und 10  $\mu\text{l}$  konz. Salzsäure gegeben und für 2 h auf 70 °C erwärmt. Die Reextraktion der Lipide erfolgte wie unter 2.11.1.1 beschrieben. Erwartet wurde, daß

- Triacylglyceride und freie Fettsäuren nicht reagieren,
- Sterine an ihrer freien Hydroxylgruppe acetyliert werden.

### 2.11.2 Charakterisierung der Lipide $R_f$ 0,45 und $R_f$ 0,83

Die mittels DC getrennten,  $^{14}\text{C}$ -Acetat-markierten Lipide mit  $R_f$  0,45 bzw.  $R_f$  0,83 wurden von der DC-Platte (vgl. 2.11.1) abgekratzt und das entsprechende Lipid mit 200  $\mu\text{l}$  Chloroform aus dem Kieselgel herausgelöst. Zur Kontrolle wurden die unmarkierten Lipide Tristearylglycerid bzw. Stearinsäure verwendet. Nach dem Laufverhalten sollte es sich bei den Lipiden um freie Fettsäuren ( $R_f$  0,45) bzw. Triacylglyceride ( $R_f$  0,83) handeln.

#### 2.11.2.1 Saure Veresterung

Zu 50  $\mu\text{l}$  Lipidlösung in Chloroform (Lipid  $R_f$  0,45 bzw.  $R_f$  0,83) wurden 10  $\mu\text{l}$  konz. Salzsäure sowie 100  $\mu\text{l}$  Methanol gegeben und die Ansätze für 1 h auf 70 °C erwärmt. Nach dem Abkühlen wurden die Lipide mit 100  $\mu\text{l}$  Chloroform reextrahiert, zur Phasentrennung 200  $\mu\text{l}$  1 M NaCl zugegeben, der wäßrige Überstand verworfen, die organische Phase bis zur Trockene eingeeengt, in 20  $\mu\text{l}$  Chloroform wieder aufgenommen und mittels DC mit dem Laufmittel Heptan/Diethylether/ Eisessig (70:30:1, v/v/v) entwickelt. Erwartet wurde, daß die freien Fettsäuren zu Fettsäuremethylestern verestert werden und die Triacylglyceride nach Hydrolyse zu Fettsäuremethylestern umgeestert werden.

#### 2.11.2.2 Alkalische Hydrolyse und Umesterung

Zu 50  $\mu\text{l}$  Lipidlösung in Chloroform (nur Lipid  $R_f$  0,83) wurden 100  $\mu\text{l}$  alkalisches Ethanol (0,7 g NaOH in 2 ml A. dest. gelöst und zu 18 ml Ethanol gegeben) und für 1 h bei 70 °C erwärmt. Nach dem Ansäuern mit 10  $\mu\text{l}$  konz. Salzsäure erfolgte die anschließende Reextraktion der Lipide sowie deren Entwicklung wie unter 2.11.2.1 beschrieben. Erwartet wurde, daß Triacylglyceride alkalisch zu Glycerin und Fettsäuren hydrolysiert werden sowie etwas Fettsäure mit Ethanol zu Fettsäureethylestern umgeestert wird.

### 2.11.3 Untersuchung der Steroidsynthese

Um ausschließen zu können, daß es sich bei dem Lipid  $R_f$  0,45 um ein Steroid handelt wurde zusätzlich die Steroidsynthese untersucht. Da *H. anomala* kein  $^3\text{H}$ -Squalen inkorporierte, wurde der Versuch mit  $^{14}\text{C}$ -Mevalonsäure als Präkursor durchgeführt. 100 ml Minimalmedium wurden mit  $2 \times 10^7$  Zellen/ml im 500-ml-Erlenmeyerkolben für 1 h vorinkubiert. Nach Zugabe von 0,05  $\mu\text{Ci/ml}$  2- $^{14}\text{C}$ -Mevalonsäure (DBED-Salz; 58 Ci/mmol) sowie 10 mg/l unmarkierte D/L-Mevalonsäure wurde für 2 h weiter inkubiert. Der Versuch wurde durch Zugabe von 0,1  $\mu\text{g/ml}$  Ambruticin gestartet. Die Probenahme und Lipidtrennung erfolgte wie unter 2.11 beschrieben.

## 2.12 Untersuchungen zur Reversibilität des Ambruticineffektes

Zur Untersuchung der Reversibilität der Ambruticin-Wirkung wurde ein Mediumwechsel durchgeführt oder zu Kulturen von *H. anomala* das Adsorberharz XAD-16 gegeben, um das Ambruticin daran zu binden.

### 2.12.1 Mediumwechsel

Hiermit sollte untersucht werden, ob sich mit 1,0 µg/ml Ambruticin behandelte Zellen von *H. anomala* nach einem Mediumwechsel wieder regenerieren können. Die prinzipielle Versuchsdurchführung erfolgte wie in 2.3.3 und 2.4.1 beschrieben. Zum Mediumwechsel wurden die Zellen aus 2 ml Kultur für 2 min bei 8.000 g abzentrifugiert und in aliquoter Menge Minimalmedium (ohne Ambruticin) resuspendiert. Die Nachweisgrenze betrug 10 KBE/ml.

### 2.12.2 XAD-Zugabe

Hier wurde die Regenerationsfähigkeit der mit 1,0 µg/ml Ambruticin behandelten Zellen (*H. anomala*) untersucht, indem zu den Ansätzen das Adsorberharzes XAD-16 gegeben wurde. An XAD-16 binden lipophile Substanzen und ein ähnliches Harz wird auch bei der Produktion von Ambruticin zu dessen kontinuierlichen Extraktion eingesetzt. Die prinzipielle Durchführung erfolgte wie unter 2.3.3 und 2.4.1 beschrieben: 2 ml Kultur wurden in ein Reagenzglas überführt, 200 µl XAD-Suspension zugegeben und diese Subkulturen unter Standardbedingungen weiterkultiviert. Um zu überprüfen, ob es sich bei den regenerierten Zellen um spontane Resistenzmutanten handelte, wurden Proben auf Minimalmedium-Agarplatten mit 0,5 µg/ml Ambruticin inkubiert.

### 2.12.3 XAD und Lipid-Extraktion

20 ml Minimalmedium in einem 100-ml-Erlenmeyerkolben wurden mit  $2 \times 10^7$  Zellen/ml für 2 h vorinkubiert. Nach Zugabe von 4 µCi 2-<sup>14</sup>C-Acetat (55 mCi/mmol) wurde für 2 h weiter inkubiert, dann 0,5 µg/ml Ambruticin zugegeben. Nach 48 h wurden 2 ml XAD-Suspension zum Ansatz gegeben und die Kultur weitere 48 h inkubiert. Nun wurde das XAD abgesiebt und mit 0,9% (w/v) NaCl gewaschen, dann wurden die Lipide mit 3 ml Methanol/Chloroform (2:1) über Nacht extrahiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und die Lipide ebenfalls mit 3 ml Methanol/Chloroform (2:1) über Nacht extrahiert. Anschließend wurden die Extrakte im N<sub>2</sub>-Strom getrocknet und in 50 µl Chloroform gelöst. Die DC-Auftrennung der Lipide erfolgte wie unter 2.11 beschrieben.



## 2.13 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Fixierlösung: 5 % (w/v) Paraformaldehyd, 2 % (v/v) Glutardialdehyd in 50 mM HEPES, pH 7,5

In einem 100-ml-Erlenmeyerkolben mit 20 ml Minimalmedium wurden  $5 \times 10^7$  Zellen/ml von *H. anomala* 1 h lang vorinkubiert, danach wurde 0,1 µg/ml Ambruticin zugegeben. Zur Probenahme wurden 2 ml Kultur abzentrifugiert (15.800 g) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 2 ml Fixierlösung über Nacht bei 4 °C gelagert. Die anschließenden Arbeiten für die TEM-Aufnahmen wurden von Dr. Lünsdorf (Abteilung Mikrobiologie, GBF Braunschweig) durchgeführt.

Cacodylat-Puffer: 0,1 M Cacodylat, pH 7,3

Osmiumtetroxid: 1 % (w/v) OsO<sub>4</sub> in Cacodylat-Puffer

Die Ansätze wurden viermal für 5 min mit Cacodylat-Puffer gewaschen und anschließend für 2 h in Osmiumtetroxid im Dunkeln fixiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen für 10 min mit Cacodylat-Puffer wurden die Proben in 2%igem Agar in Cacodylat-Puffer immobilisiert. Entwässert wurden die Proben mit einer Acetonreihe: 10%ig für 20 min, 30%ig für 20 min und 50%ig für 20 min; danach über Nacht in 70%igem Aceton mit 2 % Uranylacetat bei 4 °C. Vollendet wurde die Reihe mit 90%igem Aceton für 20 min und zweimal 100%igem Aceton für je 20 min. Danach wurden die Proben in das Einbettungsmedium nach Spurr (Epoxidharz) überführt. Zuerst wurden die Proben für 1 h mit einer Mischung aus Epoxidharz/Aceton (1:2, v/v), danach für 2 h mit einer Mischung aus Epoxidharz/Aceton (2:1, v/v) und zum Schluß über Nacht mit dem reinen Epoxidharz infiltriert. Die Proben wurden nun für 72 h bei 4 °C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur mit dem reinen Epoxidharz behandelt. Schließlich wurden die Proben in Gelatine eingekapselt.

Für die Dünnschnitte am Mikrotom (Typ Ultracut E, Fa. Leica) wurden die Proben auf 300 mesh Formvar-Folien gebracht und erst mit 1%igem Uranylacetat und anschließend mit 0,3%igem Bleicitrat nachkontrastiert. Die TEM-Aufnahmen wurden im globalen Hellfeld mit einem Transmissionselektronenmikroskop (Typ CEM 902, Fa. Zeiss) durchgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Minimale Hemmkonzentration (MHK)

Die Minimale Hemmkonzentration (MHK) bezeichnet die Antibiotikakonzentration, bei der sich die Organismen gerade eben nicht mehr vermehren können. Allerdings ist die MHK abhängig von den Kultivierungsbedingungen, unter anderem Inokulum, pH-Wert, Temperatur, Medium, Organismus [23]. Für Ambruticin betrug die MHK für die Hefe *Hansenula anomala* nahezu unabhängig vom Inokulum  $0,05 \mu\text{g/ml} \approx 0,1 \mu\text{M}$  (Abb. 11) und stieg lediglich bei  $10^7$  Zellen/ml leicht auf  $0,075 \mu\text{g/ml}$ . Die Wachstumsphase (lag- oder beginnende log-Phase) hatte ebenfalls keinen Einfluß auf die MHK bei *H. anomala* (Abb. 12). Die Resistenzmutante *H. anomala*  $R^{\text{Amb}}$  bzw. der resistente Stamm *Saccharomyces cerevisiae* hatte eine MHK von  $> 10 \mu\text{g/ml}$ .

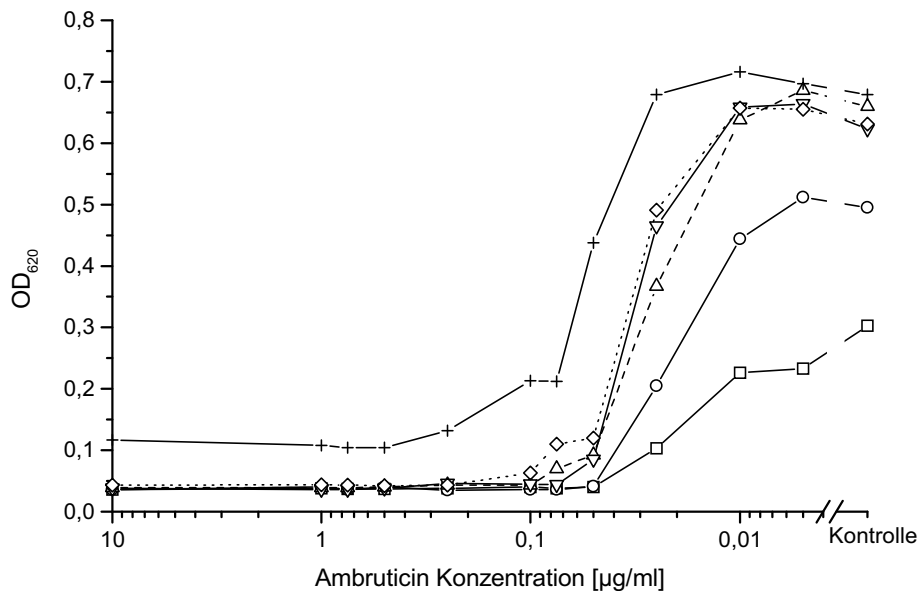


Abb. 11: Einfluß der Inokulumgröße ( $\square 10^2$ ;  $\circ 10^3$ ;  $\triangle 10^4$ ;  $\nabla 10^5$ ;  $\diamond 10^6$ ;  $+ 10^7$  Zellen/ml) von *H. anomala* auf die MHK von Ambruticin. Für Kulturen mit einem Inokulum  $> 10^7$  Zellen/ml war wegen der hohen Ausgangs- $\text{OD}_{620}$  eine MHK-Bestimmung mit dieser Methode nur unzuverlässig

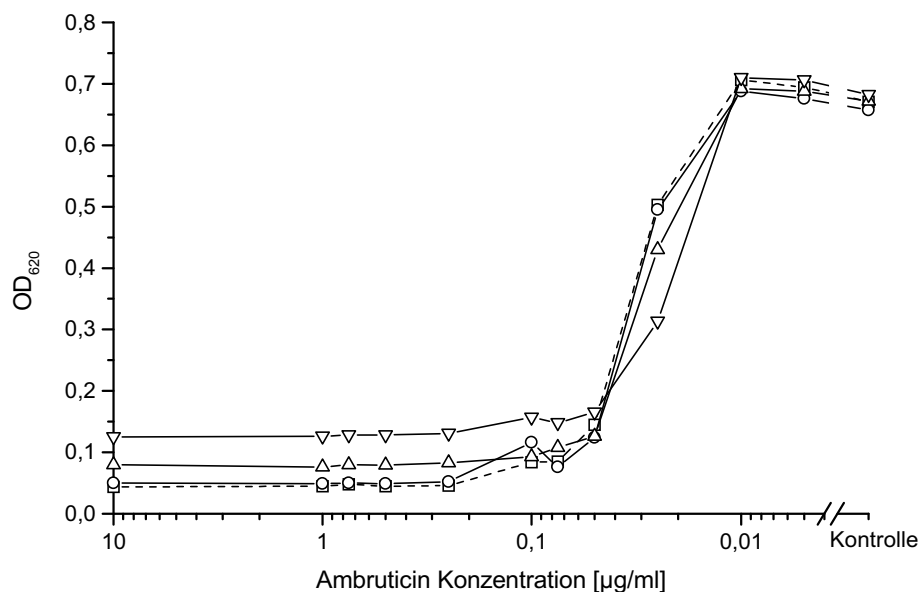


Abb. 12: Ambruticin-Zugabe zu frischen Kulturen von *H. anomala* ( $10^6$  Zellen/ml) nach 0 ( $\square$ ), 2 ( $\circ$ ), 4 ( $\triangle$ ) bzw. 6 ( $\nabla$ ) h, so daß sich die Zellen zum Zeitpunkt der Zugabe in unterschiedlichen Wachstumsphasen befanden

### 3.1.1 Absterbekurve

Durch Ambruticin wurde die Vermehrungsfähigkeit der Hefezellen sehr schnell reduziert, und zwar um 99,9% bei einer 20fachen MHK binnen 2 – 3 h, bei einer doppelten MHK noch binnen 4 – 6 h, und unterhalb der MHK wirkte es noch fungistatisch (Abb. 13). Wurden die Zellen jedoch in Wuchsmedium bei 0 °C kultiviert, wurde die Vermehrungsfähigkeit auch bei 20facher MHK innerhalb von 6 h nicht beeinträchtigt (Abb. 13).

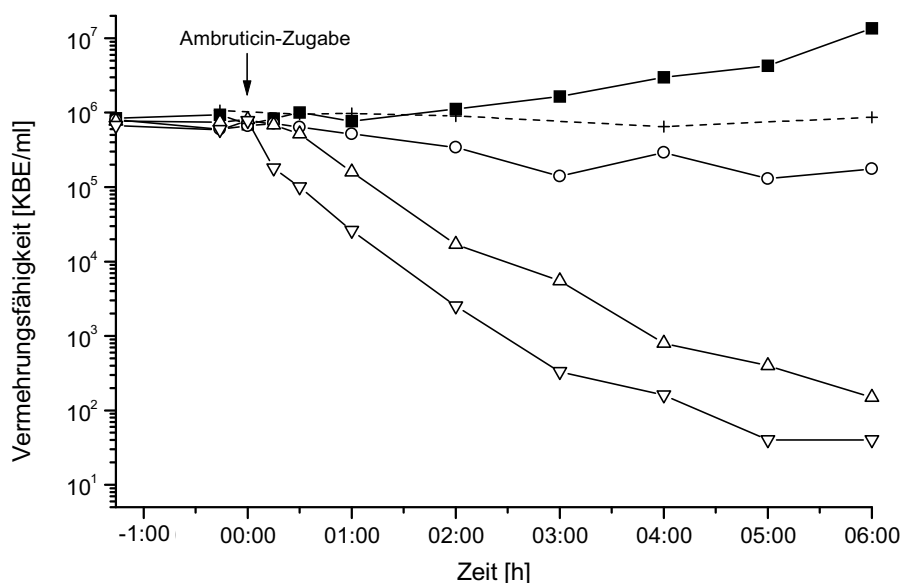


Abb. 13: Effekt von Ambruticin auf die Vermehrungsfähigkeit von *H. anomala* in Medium bei 30 °C mit 0,01 µg/ml ( $\circ$ ), 0,1 µg/ml ( $\triangle$ ), 1,0 µg/ml ( $\nabla$ ) sowie 1,0 µg/ml (+) bei 0 °C. Die Kontrolle wuchs ohne Ambruticin ( $\blacksquare$ )

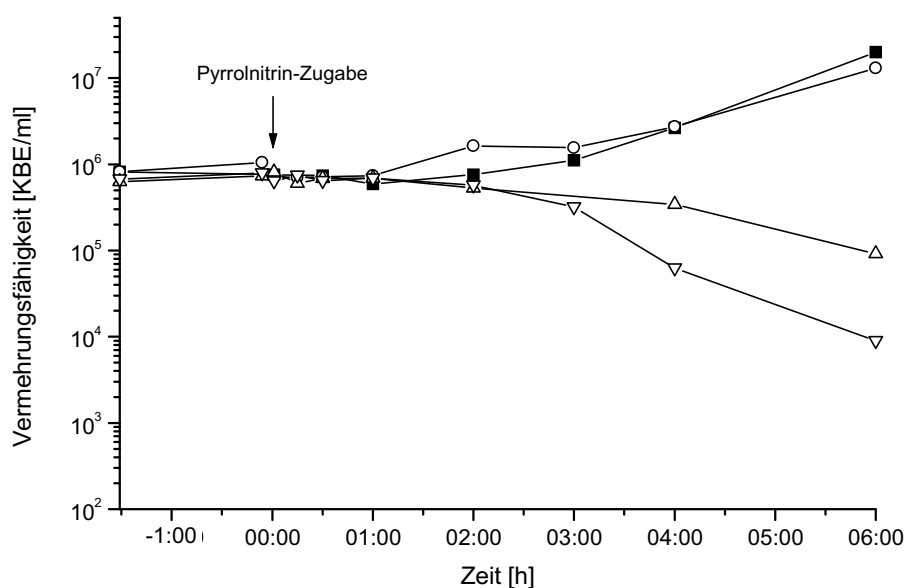


Abb. 14: Effekt von Pyrrolnitrin auf die Vermehrungsfähigkeit von *H. anomala* mit 0,01 µg/ml (○), 0,1 µg/ml (△) und 1,0 µg/ml (▽). Die Kontrolle wuchs ohne Pyrrolnitrin (■)

Obwohl Pyrrolnitrin ähnlich wie Ambruticin eine MHK von 0,1 µg/ml ( $\approx 0,39 \mu\text{M}$ ) hat, reduzierte es die Vermehrungsfähigkeit der Hefen deutlich langsamer und wirkte im sub-MHK-Bereich nicht fungistatisch (Abb. 14).

### 3.1.2 pH-Wert

Zur pH-Abhängigkeit der MHK von Ambruticin gab es bisher unterschiedliche Angaben: Ringel et al. [60] und Simpkin [64] fanden, daß Ambruticin S bei niedrigen pH-Werten toxischer wirkte als bei hohen. Für das amphotere Ambruticin VS-3 wurde für den pH-Bereich von 5,0–8,0 keine pH-Abhängigkeit der Toxizität bei *H. anomala* festgestellt (Tab. 16).

Tab. 16: Einfluß des pH-Wertes auf die MHK für Ambruticin VS-3

Minimalmedium, gepuffert mit	MHK [µg/ml]
MES, 50 mM, pH 5	0,05
MES, 50 mM, pH 6	0,05
HEPES, 50 mM, pH 7	0,05
HEPES, 50 mM, pH 8	0,05 <sup>1)</sup>
ungepuffert	0,05

<sup>1)</sup> Zellen sind schlecht gewachsen

### 3.1.3 Antagonisten

Die Suche nach Antagonisten ergab, daß organische Säuren die MHK von 0,075–0,10 µg/ml auf 0,25–0,5 µg/ml leicht erhöhten (Tab. 17), während das Wachstum auf anderen C-Quellen

(Tab. 18) oder N-Quellen (Tab. 20) keinen Einfluß auf die MHK hatten. Ebenso hatte die Supplementierung von Minimalmedium mit einigen Lipiden, Nucleinsäuren oder Vitaminen keinen Einfluß auf die MHK (Tab. 19). Somit konnte durch Umgehung eines möglichen, durch Ambruticin gesetzten metabolischen Blocks der Wirkmechanismus nicht eingegrenzt werden.

Tab. 17: MHK von Ambruticin bei Wachstum mit verschiedenen organischen Säuren

Mediumzusatz (organische Säuren, 10 g/l)	Minimalmedium ohne Glucose MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Minimalmedium MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]
Na-Pyruvat	0,25	0,5
Na- $\alpha$ -Ketoglutarat	0,25	0,5
Na-Acetat $\times 3 \text{ H}_2\text{O}$	0,25 <sup>1)</sup>	0,5
K-Glyoxylat	0,25 <sup>1)</sup>	0,5

<sup>1)</sup> Zellen sind schlecht gewachsen

Tab. 18: MHK-Werte von Ambruticin bei Wachstum auf Minimalmedium (MM) bzw. Minimalmedium ohne Glucose (MM ohne Glc) mit verschiedenen C-Quellen

Mediumzusatz (Zucker, 10 g/l)	MM ohne Glc: MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]	MM: MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Mediumzusatz (Aminosäuren, 10 g/l)	MM ohne Glc: MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]	MM: MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]
Glucose $\times \text{H}_2\text{O}$	0,05 – 0,075		Glutamat	0,05	0,05
Fructose	0,05 – 0,075		Lysin	<sup>1)</sup>	0,05
Maltose	0,05		Valin	<sup>1)</sup>	0,075
Galactose	0,025 – 0,075		Aspartat	0,05	0,05
Mannose	0,025 – 0,075	0,05	Serin	0,05 – 0,25	0,075
Glycerin	0,025 – 0,075	0,05	Methionin	0,05 – 0,075	0,05
Ribose	0,075		Homoserin	0,075	0,05
3-Phosphoglycerat	0,05 – 0,25	0,075 – 0,25	Cystein	0,05	0,05

<sup>1)</sup> Zellen sind nicht gewachsen

Tab. 19: MHK-Werte von Ambruticin bei Wachstum auf Minimalmedium mit ausgewählten Lipiden, Nucleinsäuren bzw. Vitamincocktail

Mediumzusatz	MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Mediumzusatz	MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]
Ergosterin	0,05	Vitaminelösung	0,075
Fungal Lipids (Fa. Sigma)	0,05	Desoxyribose	0,125
Phosphatidylcholin-distearyl	0,025	dAdo, dCyd, dGuo, dThd	0,10
Linolsäure	0,10	dAMP, dCMP, dGMP, dTMP	0,10

Tab. 20: MHK-Werte für Ambruticin nach Wachstum auf Minimalmedium mit verschiedenen N-Quellen

N-Quelle	MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]	N-Quelle	MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]
$\text{NH}_4\text{NO}_3$ ( $\hat{=}$ Minimalmedium)	0,05	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,075
$\text{KNO}_3$	0,075	Asparagin	0,075

### 3.1.4 Aerobe/anaerobe Kultivierung

Unter anaeroben Bedingungen war *H. anomala* mit einer  $\text{MHK}_{\text{anaerob}}$  von  $0,063 \mu\text{g/ml}$  etwas sensibler gegenüber Ambruticin geworden als unter normalen Bedingungen mit einer  $\text{MHK}_{\text{aerob}}$  von  $0,125 \mu\text{g/ml}$  (Abb. 15). Der Entkoppler 2,4-Dinitrophenol hatte keinen Einfluß auf die MHK (Abb. 16). Wie zu erwarten wuchs *H. anomala* unter anaeroben Bedingungen oder mit dem Entkoppler auch in der Kontrolle ohne Ambruticin deutlich schlechter. Mit Pyrrolnitrin als Antibiotikum konnten bei den unterschiedlichen Wachstumsbedingungen keine Unterschiede in der MHK festgestellt werden (Abb. 15).

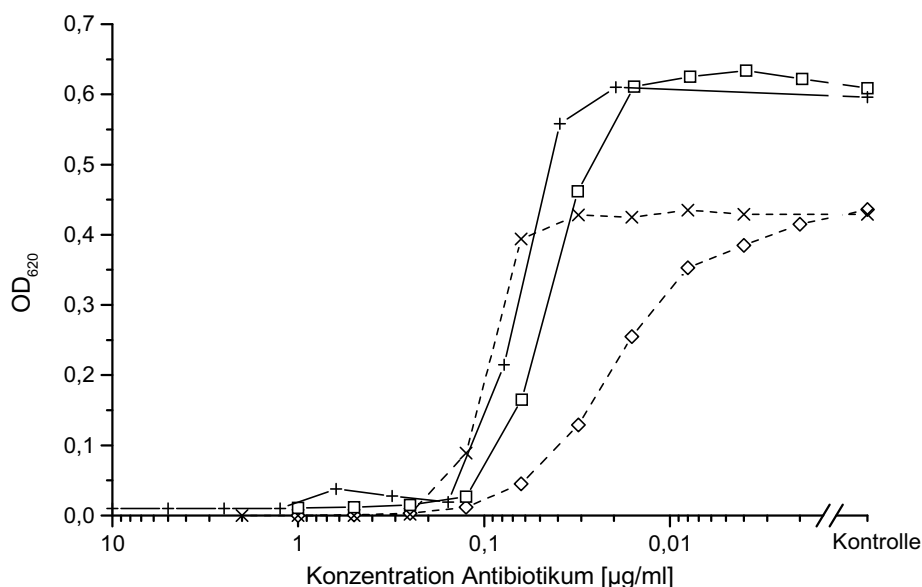


Abb. 15: Auswirkung unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen auf die MHK von *H. anomala* von Ambruticin bzw. Pyrrolnitrin: aerob ( $\square$ ), anaerob ( $\diamond$ )

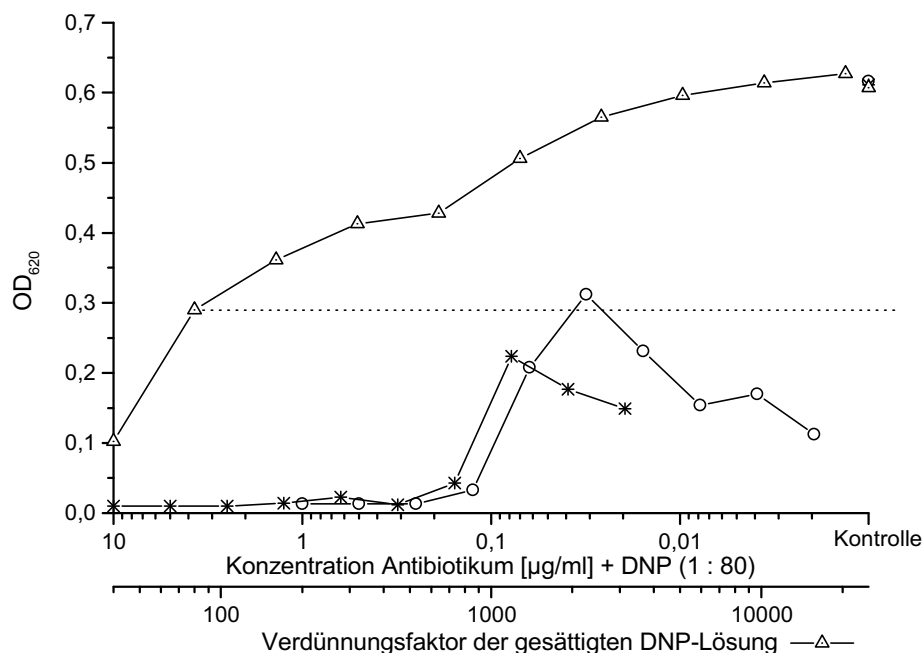


Abb. 16: Einfluß verschiedener Verdünnungen von 2,4-Dinitrophenol (DNP) auf das Wachstum von *H. anomala* ( $\Delta$ ) sowie die MHK von Ambruticin bzw. Pyrrolnitrin mit 2,4-Dinitrophenol bei 1:80-Verdünnung (○/\*)

Die Resistenzmutante *H. anomala* R<sup>Amb</sup> zeigte bis 10  $\mu\text{g/ml}$  Ambruticin weder aerob noch anaerob Wachstumshemmungen; da mit Pyrrolnitrin sowohl aerob als auch anaerob bei 10  $\mu\text{g/ml}$  eine deutliche Wachstumsreduzierung zu erkennen war, war diese nicht auf die unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen zurückzuführen (Abb. 17).

Auffällig war, daß die Resistenzmutante sowohl aerob als auch anaerob in der Kontrolle deutlich schlechter wuchs als die sensitiven Zellen.

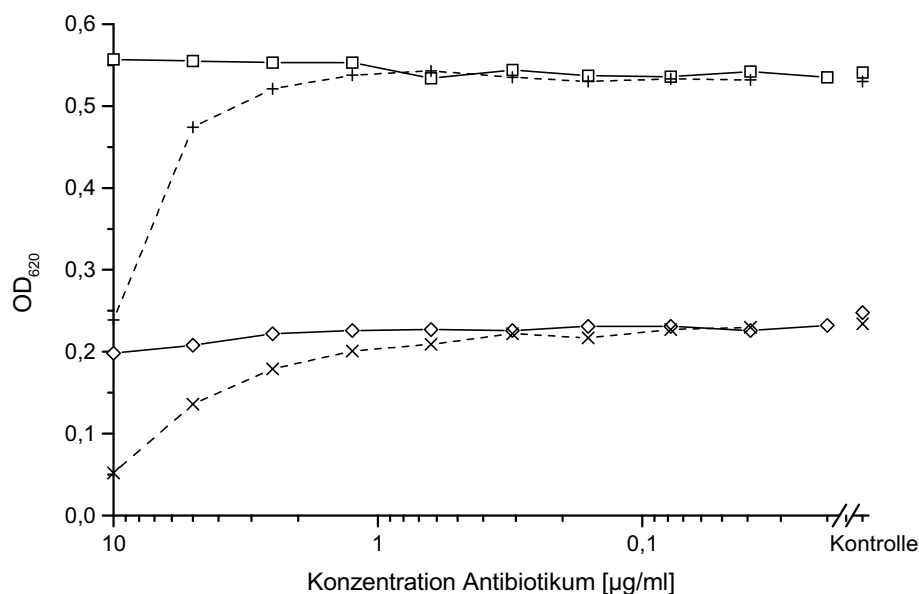


Abb. 17: Auswirkung unterschiedlicher Kultivierungsbedingungen von *H. anomala* R<sup>Amb</sup> auf die MHK von Ambruticin bzw. Pyrrolnitrin: aerob ( $\square/+$ ) bzw. anaerob ( $\diamond/\times$ )

### 3.1.5 Adsorption von Ambruticin an Zellen, Zellextrakten und Seren

#### 3.1.5.1 Adsorption an Zellen

Wie Abb. 18 zeigt, konnte nach 30-minütiger Behandlung von  $10^7$  Zellen/ml mit  $10\ \mu\text{g/ml}$  Ambruticin dieses durch die Zellen dem Medium nicht entzogen werden, denn die MHK unterschied sich mit  $0,078\ \mu\text{g/ml}$  nicht von jener der Kontrolle. Das bedeutet, daß weder die stoffwechselaktiven resistenten Zellen (in Minimalmedium) das Ambruticin entgifteten (ein möglicher Resistenzmechanismus), noch daß es an den stoffwechselinaktiven Zellen (in A. dest.) adsorbierte und somit dem Medium entzogen worden war.

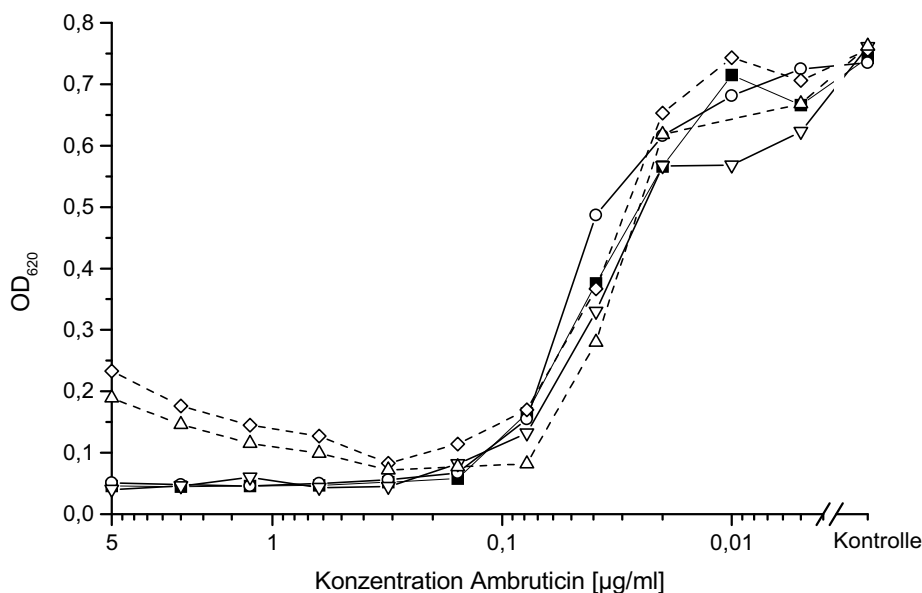


Abb. 18: Bestimmung der MHK im Medium (Minimalmedium bzw. A. dest.), das zuvor mit  $10^7$  Zellen/ml für 30 min behandelt wurde: Vorbehandlung mit *H. anomala* in Minimalmedium (○) bzw. A. dest. (▽) sowie mit *H. anomala*  $R^{\text{Amb}}$  in Minimalmedium (◇) bzw. A. dest. (Δ) im Vergleich zur Kontrolle (ohne Vorbehandlung ■)

Durch das Zentrifugieren konnten nicht alle Zellen pelletiert werden und aus dem Überstand wuchsen Zellen auf den Agarplatten. Dieses zeigte sich auch bei der MHK-Bestimmung: In den ersten Vertiefungen mit von resistenten Zellen vorbehandeltem Medium zeigte sich geringes Wachstum dieser (verschleppten) resistenten Zellen. Durch die Verdünnungsreihe nahm deren Konzentration im Medium ab, während die Konzentration der sensitiven Zellen in allen Vertiefungen (anfänglich) gleich war. Weil die resistenten Zellen insgesamt langsamer als die sensitiven Zellen wuchsen, konnte das Wachstum der resistenten Zellen (erste Vertiefungen) von dem der sensitiven Zellen (letzte Vertiefungen) unterschieden werden.

#### 3.1.5.2 Adsorption durch Zellextrakte

Die Zugabe von 10% (v/v) Zellextrakt von *H. anomala*  $R^{\text{Amb}}$  sowie 1% (v/v) unterschiedlicher Zusatzlösungen hatte keinen Effekt auf die MHK (Abb. 19). Ebenso konnte bei den Kontrollen (Zellextrakt von *H. anomala* bzw. Aufschlußpuffer mit den entsprechenden



Zusatzlösungen) kein Einfluß auf die MHK erkannt werden. Dieses könnte daraufhin deuten, daß die resistenten Zellen das Ambruticin nicht verändern.

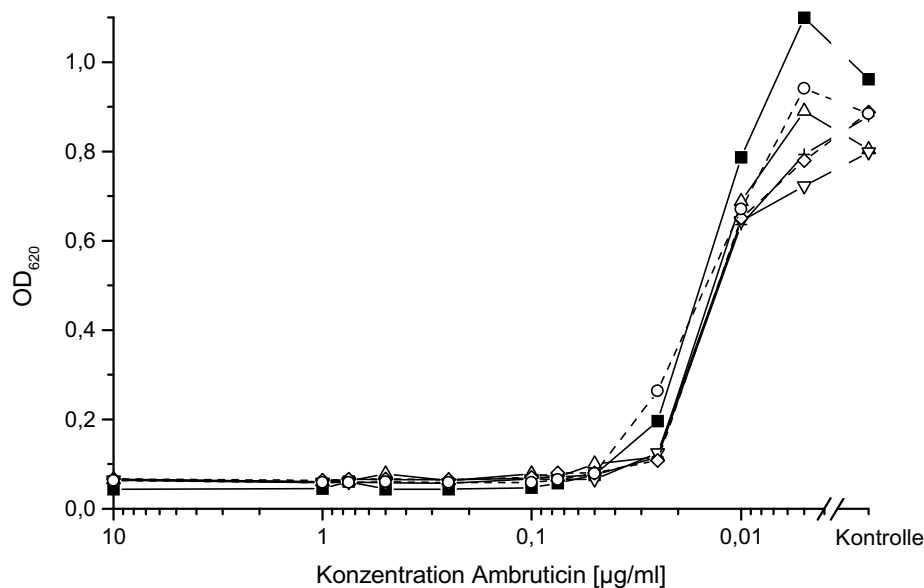


Abb. 19: Keine Änderung der MHK für *H. anomala* (■) durch Zugabe von *H. anomala*  $R^{Amb}$ -Zellextrakt pur (+) bzw. supplementiert mit ATP/GTP ( $\Delta$ ),  $NAD(P)^+$  ( $\nabla$ ),  $NAD(P)H + H^+$  ( $\diamond$ ), FAD/FMN ( $\circ$ )

### 3.1.5.3 Adsorption durch Kaninchen-Serum

Durch Zugabe von Kaninchen-Serum konnte die MHK für Ambruticin von 0,05 µg/ml auf 0,25 – 0,5 µg/ml deutlich erhöht werden (Abb. 20). Der Anstieg der MHK folgte dabei der Erhöhung des zugegebenen Serums, was vermuten läßt, daß das Ambruticin an einen Faktor bindet und somit den sensitiven Hefezellen nicht mehr zur Verfügung stand.

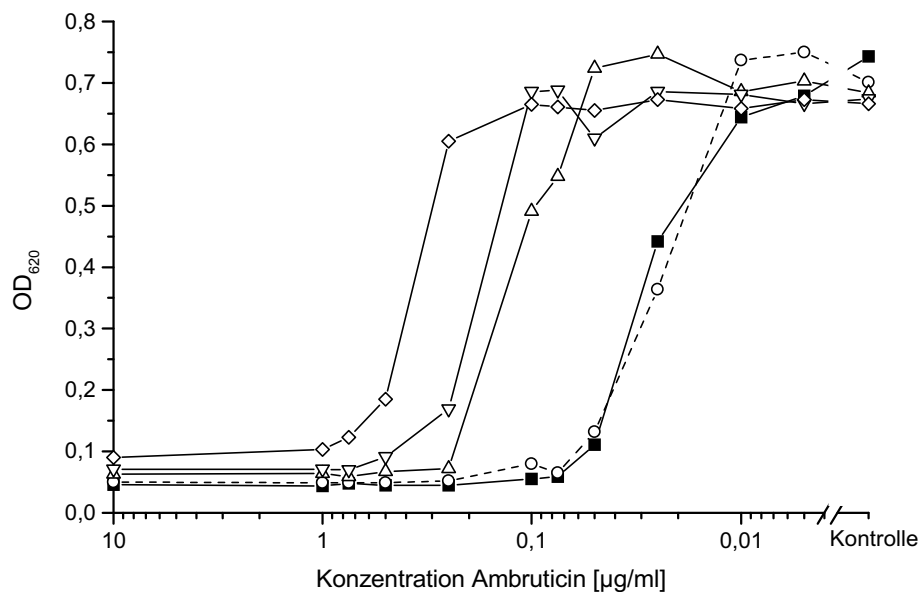


Abb. 20: Erhöhung der MHK durch Erhöhung des zugegebenen Kaninchen-Serums zum Medium: 1 % ( $\circ$ ), 5 % ( $\Delta$ ), 10 % ( $\nabla$ ), 20 % ( $\diamond$ ) sowie ohne Serum (■)

Eine MHK-Bestimmung nach Ultrafiltration des Serums mit einer Ausschlußgröße von 100.000 [Da] ergab, daß nach Zugabe von 10% (v/v) Filtrat die MHK nicht stieg, wohl aber nach Zugabe der gleichen Menge Filtrationsüberstand (Abb. 21). Das bedeutet, daß der Ambruticin-adsorbierende Faktor so groß ist, daß er den Filter nicht passieren konnte. Das Ambruticin adsorbierte nicht an die Filtermembran, da nach Filtration von Ambruticin-haltigem Minimalmedium die (scheinbare) MHK nicht anstieg (Abb. 21).

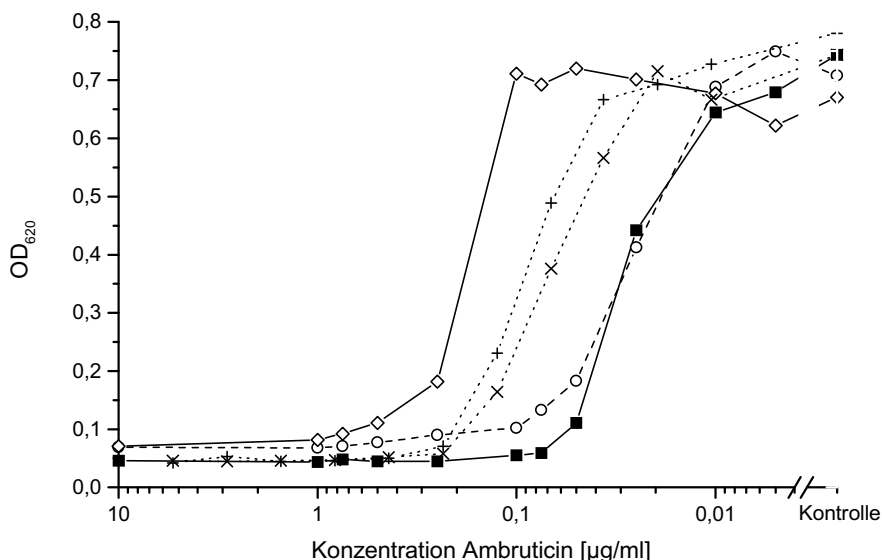


Abb. 21: MHK-Bestimmung nach Zugabe von 10 % ultrafiltriertem Kaninchen-Serum (Ausschlußgröße 100.000 [Da]): Filtrat (○), Überstand (◇) und Kontrolle ohne Serum (■). Die Differenz in der MHK zwischen filtriertem (Ambruticin-haltigen) Minimalmedium (+) und unfiltriertem Minimalmedium (×) zeigt, daß das Ambruticin nicht an der Filtermembran adsorbierte

Der Ambruticin-bindende Faktor des Serums kann jedoch durch Erhitzen auf 95 °C oder durch ansäuern mit Trichloressigsäure inaktiviert werden (Abb. 22). Dieses, sowie die vermutliche Größe des Faktors legen nahe, daß es sich um ein Protein handelt.

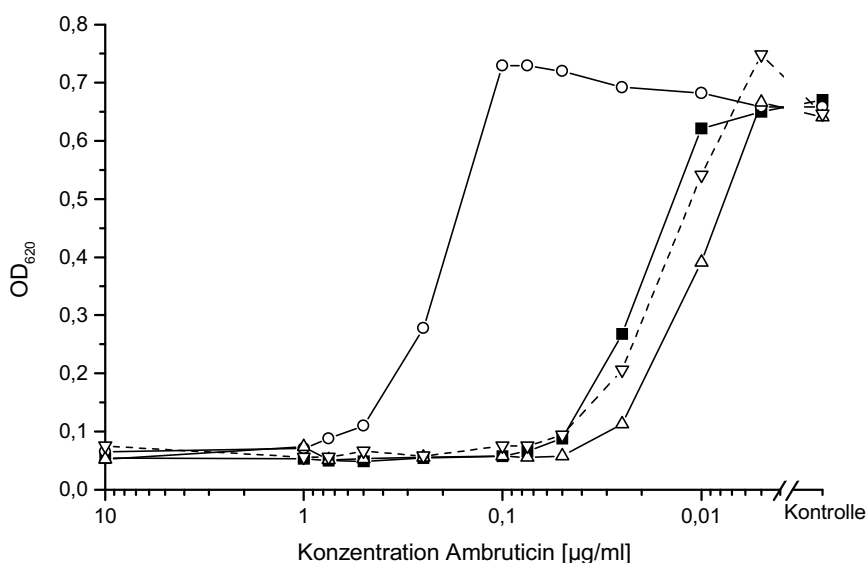


Abb. 22: MHK-Bestimmung nach Zugabe von 10 % vorbehandeltem Kaninchen-Serum: TCA-Fällung (△), erhitzen auf 95 °C (▽) und Kontrollen mit unbehandeltem Serum (○) bzw. ohne Serum (■)

### 3.1.6 Protoplasten

Die Vollständigkeit der Protoplastenbildung wurde nur qualitativ bestimmt, indem die Proben mikroskopiert wurden. Es waren keine Zellen mit Zellwand zu sehen. Die *H. anomala* R<sup>Amb</sup> Protoplasten waren deutlich kleiner als die von *H. anomala* und hatten eine erheblich geringere Zelldichte. Die KBE-Bestimmung nach dem letzten Waschschrift ergab  $8,9 \times 10^4$  Zellen/ml für *H. anomala* und  $1,5 \times 10^3$  Zellen/ml für *H. anomala* R<sup>Amb</sup>.

Die Protoplasten wurden in unterschiedlichen Medien und mit unterschiedlichen Osmo-stabilisatoren regeneriert. Die MHK für die *H. anomala* Protoplasten betrug wie auch für die normalen Zellen 0,05 µg/ml, die Protoplasten der resistenten Zellen konnten ebenfalls wie die normalen resistenten Zellen bis 10 µg/ml wachsen (Tab. 21). Im Unterschied zu den normalen Zellen, konnte auf Grund des langsameren Wachstums die MHK der Protoplasten erst nach drei Tagen bestimmt werden, dafür war aber der Übergang von Wachstum zu kein Wachstum schärfer zu erkennen.

Tab. 21: MHK-Bestimmung von *H. anomala* und *H. anomala* R<sup>Amb</sup> Protoplasten in verschiedenen Medien

Medium	<i>H. anomala</i> MHK [µg/ml]	<i>H. anomala</i> R <sup>Amb</sup> MHK [µg/ml]
a) Minimalmedium mit 1 M Sorbit	0,05	> 10,0
b) Minimalmedium mit 0,45 M Mannit	0,05	> 10,0
c) Minimalmedium mit 0,17 M Mannit	0,05	> 10,0
d) Malzextrakt-Medium mit 0,45 M Mannit	0,05	> 10,0

### 3.1.7 Liposomen

In den Ansätzen mit Propidiumjodid-beladenen Liposomen konnte die DNA der Protoplasten von *H. anomala*, wenn auch nicht sehr ausgeprägt, angefärbt werden, während freies, nicht membrangängiges Propidiumjodid dieses nicht vermochte. Das bedeutet, daß der Einschluß von Propidiumjodid in die Liposomen, wenn auch nicht sehr gut, prinzipiell funktioniert hatte. Die Protoplasten der resistenten Zellen konnten nicht regeneriert werden. Die Liposomen selber wirkten nicht toxisch, da die Protoplasten der sensitiven Zellen auch bei dem höchsten Liposomengehalt regeneriert werden konnten (Tab. 22). Die MHK für die Protoplasten der sensitiven Zellen betrug für direkt zugegebenes Ambruticin 0,025 µg/ml. Bei den sensitiven Zellen konnte durch Zugabe der Liposomen nicht unterschieden werden, ob das Ambruticin in den Liposomen eingeschlossen war oder frei vorlag, da die Zellen in beiden Fällen abgetötet worden wären.

Tab. 22: Wachstum von Protoplasten nach Behandlung mit Liposomen mit unterschiedlichem (theoretisch maximalem) Ambruticin oder Propidiumjodid (PJ) Gehalt

Protoplasten von <i>H. anomala</i>				<i>H. anomala</i> R <sup>Amb</sup>		
Liposomen (verdünnt)	Amb	Methanol	PJ	Amb	Methanol	PJ
1 : 1 $\hat{=}$ 10 $\mu$ g/ml	-	+	+ *	Zellen konnten nicht regeneriert werden		
1 : 10 $\hat{=}$ 1 $\mu$ g/ml	-	+	+ *			
1 : 100 $\hat{=}$ 0,1 $\mu$ g/ml	-	+	+			
1 : 1.000 $\hat{=}$ 0,01 $\mu$ g/ml	+	+	+			
-: kein Zellwachstum      +: Zellwachstum      *: Färbung der DNA mit PJ						

Die Zugabe von Liposomen (in beiden Konzentrationen sowie mit und ohne Ambruticin) führte zu keiner deutlichen Änderung in der Stoffwechselaktivität bei den L929-Mauszellen im Vergleich zu Zellen, die nicht mit Liposomen behandelt worden sind (Tab. 23). Die Mauszellen sind also durch die Liposomen nicht geschädigt worden, allerdings konnte auch nicht gezeigt werden, daß durch Zugabe der Ambruticin-haltigen Liposomen die Mauszellen in ihrem Wachstum binnen 24 h gehemmt worden wären. Das Kälber-Serum im Medium dürfte dabei keinen Einfluß gehabt haben, da 10% (v/v) Serum bei *H. anomala* die MHK zwar von 0,05  $\mu$ g/ml auf 0,5  $\mu$ g/ml erhöhte (vgl. 3.1.5.3), die eingesetzte Ambruticin-Konzentration hier aber 1 bzw. 10  $\mu$ g/ml betrug.

Tab. 23: Einfluß von Liposomen auf die Stoffwechselaktivität von L929-Mauszellen, gemessen als WST-1 Färbung (OD<sub>450</sub>) nach 24 h

Zugegebene Liposomen	Amb	Methanol	Tris-Puffer
1 : 1 $\hat{=}$ 10 $\mu$ g/ml	0,339	0,456	0,342
1 : 10 $\hat{=}$ 1 $\mu$ g/ml	0,291	0,392	0,342

Es konnten also für die L929-Mauszellen untoxische Liposomen hergestellt werden und es konnte etwas Propidiumjodid mit den Liposomen in Hefe-Protoplasten transportiert werden. Allerdings konnte nicht nachgewiesen werden, wieviel Ambruticin in die Liposomen eingeschlossen worden war und somit auch nicht, ob durch die Liposomen Ambruticin in die Zellen transportiert worden war. Damit konnte bei den resistenten Zellen nicht unterschieden werden, ob eine Aufnahme- oder Wirkortresistenz vorliegt.

### 3.1.8 Permeabilisierung

Durch Permeabilisierung sind die sensitiven Hefen etwas empfindlicher gegenüber Ambruticin geworden, während die resistenten Hefen davon unabhängig bis 10  $\mu$ g/ml Ambruticin gleich gut wuchsen (Abb. 23).

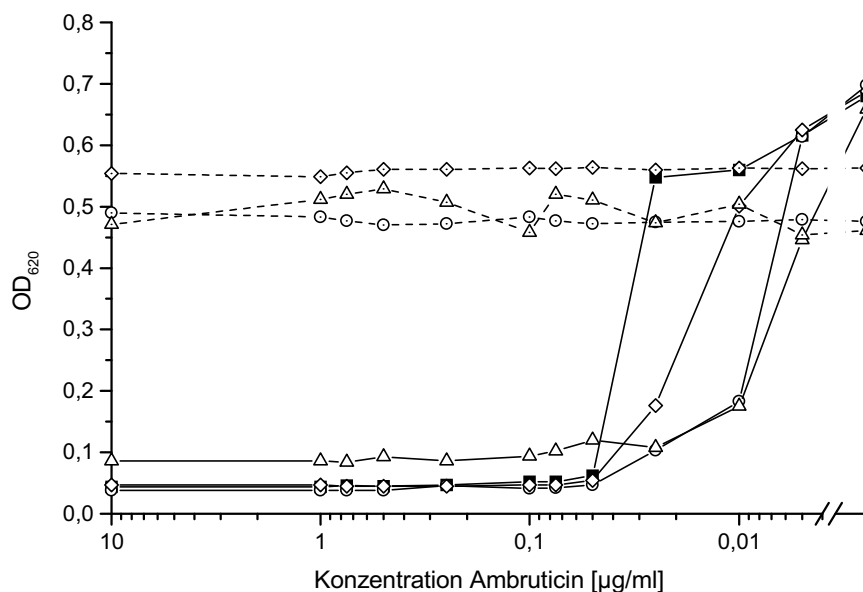


Abb. 23: MHK nach Permeabilisierung von *H. anomala* (sensitiv/resistent), mit Lyticase (○/○), CHCl<sub>3</sub>/SDS (△/△) oder Toluol (◇/◇). Unbehandelte, sensitive Zellen dienten als Kontrolle (■)

### 3.1.9 Stoffwechselaktivität

Bis 60 min nach Zugabe von 1,0 µg/ml Ambruticin bzw. 0,5 µg/ml Pyrrolnitrin waren bezüglich der Stoffwechselaktivität von *H. anomala* keine Unterschiede zur Kontrolle zu erkennen. Erst danach nahm die Stoffwechselaktivität deutlich ab, während sie bei 0,1 µg/ml Ambruticin (etwa MHK) ca. 2 h parallel zur Kontrolle verlief bevor sie nach 6 h stoppte. Bei 0,01 µg/ml Ambruticin, also im sub-MHK-Bereich, konnte zum Teil sogar eine im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Stoffwechselaktivität nachgewiesen werden (Abb. 24).

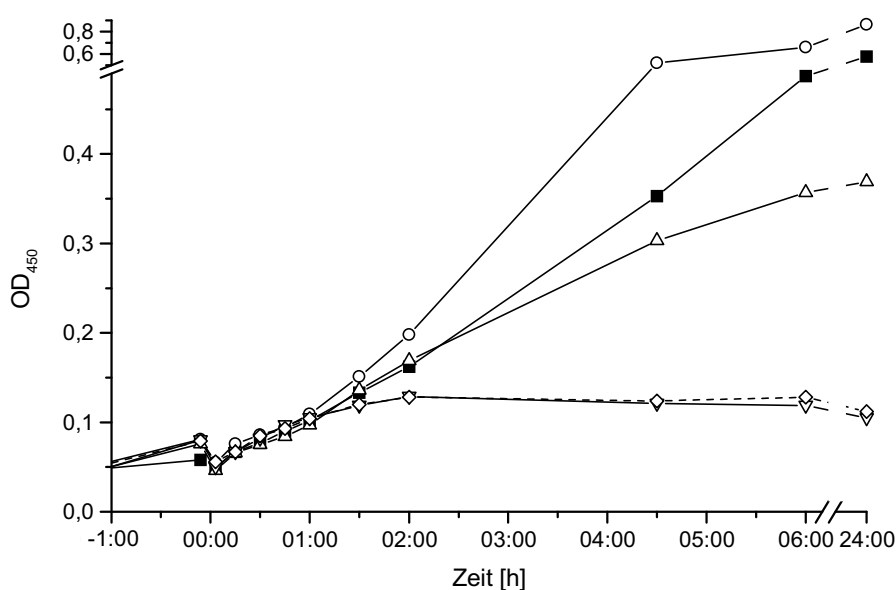


Abb. 24: Stoffwechselaktivität von *H. anomala* gemessen als WST-1-Färbung ( $\Delta OD_{450}$ ) mit 0,01 µg/ml (○), 0,1 µg/ml (△), 1,0 µg/ml (▽) Ambruticin und 0,5 µg/ml Pyrrolnitrin (◇). Kontrolle ohne Ambruticin (■)

### 3.2 Kreuzresistenz

Die Kreuzresistenz zwischen Ambruticinen, Jerangoliden und Pyrrolnitrin wurde von Gerth et. al. entdeckt [21]. Wie Abb. 25 zeigt, konnte *H. anomala* mit 0,1 µg/ml Ambruticin ( $\cong$  0,2 µM) oder Pyrrolnitrin ( $\cong$  0,4 µM) nicht mehr wachsen, während mit 0,05 µg/ml Pyrrolnitrin ( $\cong$  0,2 µM) bzw. Ambruticin ( $\cong$  0,1 µM) die Zellen noch ungehindert wachsen konnten. Wurden aber beide Antibiotika in  $1/2$ -MHK zugegeben, wurde das Wachstum vollständig unterbunden. Das bedeutet, daß bei Konzentrationen, bei denen die Einzelsubstanzen noch nicht toxisch wirkten, sie zusammen toxisch waren, Pyrrolnitrin und Ambruticin wirkten also additiv synergistisch.

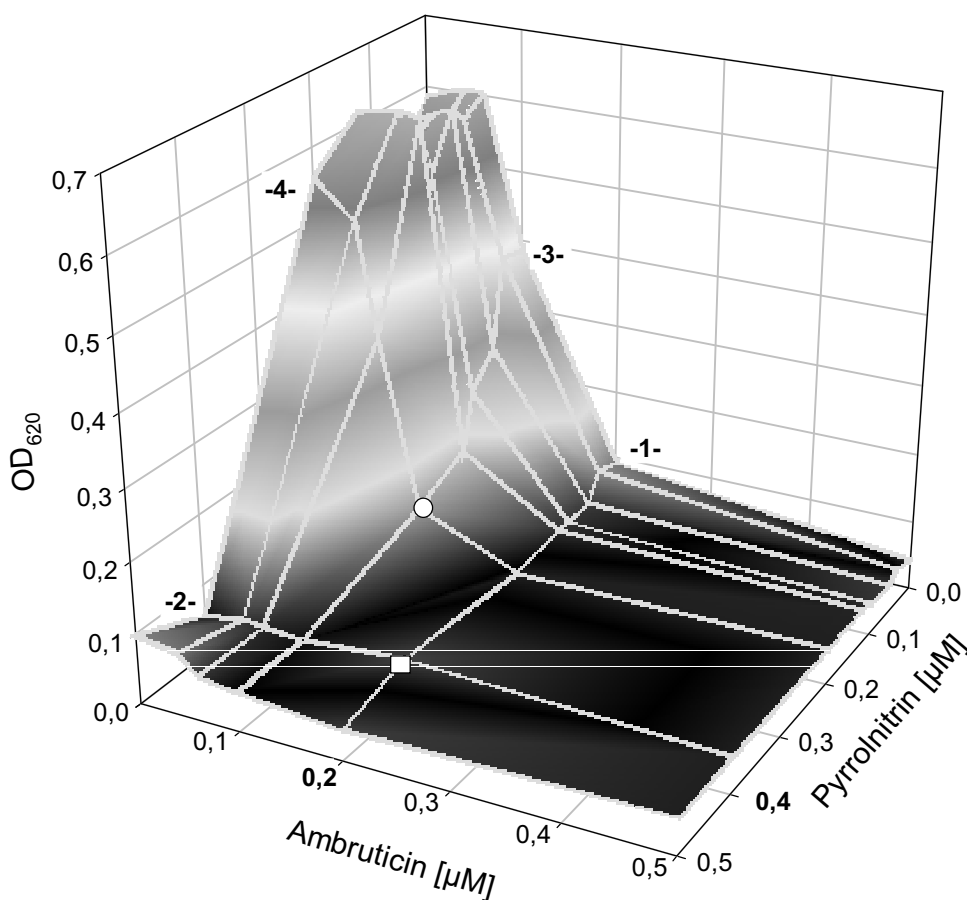


Abb. 25: Untersuchung auf Synergismus. Die MHK für Ambruticin (-1-) betrug 0,2 µM, für Pyrrolnitrin (-2-) 0,4 µM. In Kombination wirkten Ambruticin und Pyrrolnitrin synergistisch: Bei jeweils  $1/2$ -MHK konnte *H. anomala* wachsen (-3- für Ambruticin, -4- für Pyrrolnitrin) während beide Antibiotika zusammen bei diesen Konzentrationen das Wachstum unterbunden haben (○)

Ebenso konnte gezeigt werden, daß Ambruticin und Jerangolid A synergistisch wirkten: Die MHK für Ambruticin betrug 0,05 µg/ml ( $\cong$  0,1 µM) und für Jerangolid A 0,1 µg/ml ( $\cong$  0,25 µM). In den sub-MHK-Kombinationen 0,02 µg/ml ( $\cong$  0,04 µM) Ambruticin + 0,05 µg/ml ( $\cong$  0,125 µM) Jerangolid A bzw. 0,03 µg/ml ( $\cong$  0,06 µM) Ambruticin + 0,03 µg/ml ( $\cong$  0,075 µM) Jerangolid A konnte *H. anomala* nicht mehr wachsen (Abb. 26).

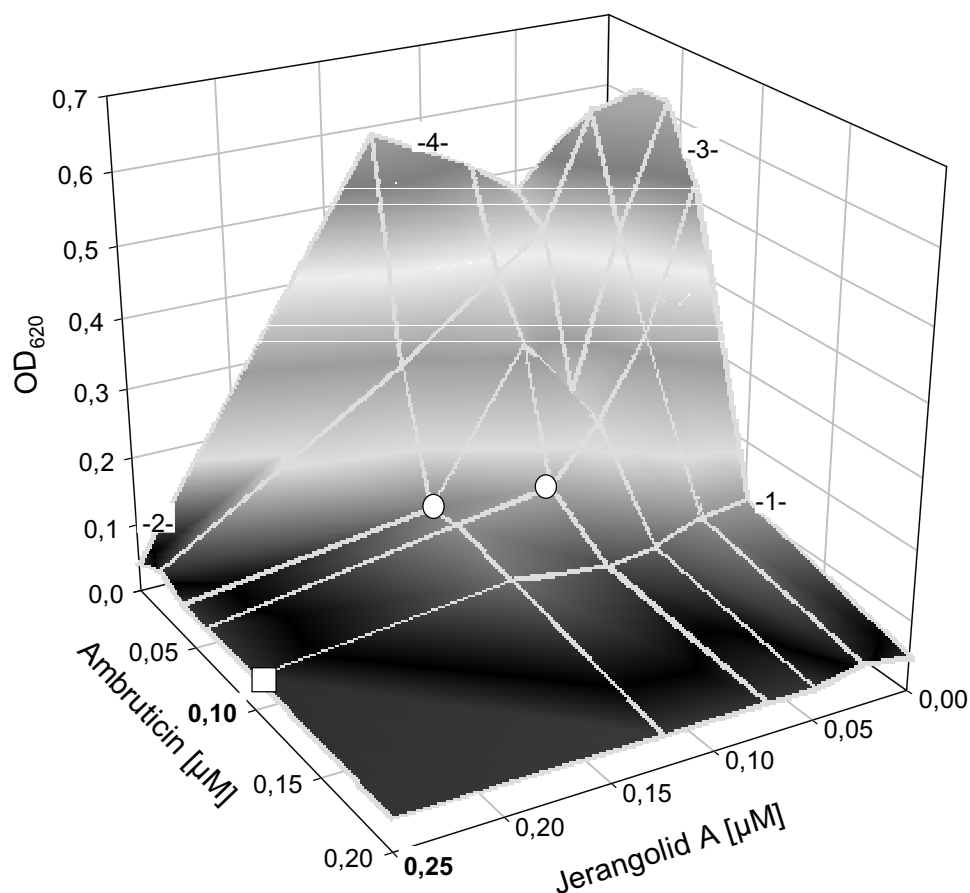


Abb. 26: Untersuchung auf Synergismus. Die MHK für Ambruticin (-1-) betrug 0,1 µM, für Jerangolid (-2-) 0,25 µM. In Kombination wirkten Ambruticin und Pyrrolnitrin synergistisch: Bei sub-MHK konnte *H. anomala* wachsen (-3- für Ambruticin, -4- für Jerangolid) während beide Antibiotika zusammen bei diesen Konzentrationen das Wachstum unterbunden haben (○)

Zwischen *H. anomala* und *H. anomala* R<sup>Amb</sup> konnten neben den bekannten Kreuzresistenzen keine weiteren Kreuzresistenzen nachgewiesen werden. Es traten also keine Wachstumsunterschiede zwischen den Ambruticin-sensitiven und Ambruticin-resistenten Zellen auf, wenn diese mit verschiedenen Antibiotika kultiviert wurden. Tab. 24 zeigt die MHK-Werte der getesteten Antibiotika.

Tab. 24: MHK-Werte verschiedener Antibiotika für *Hansenula*

Antibiotika, für die <i>Hansenula</i> sensitiv war	MHK [µg/ml]
5-Fluoruracil (Hemmung der Thymidylat-Synthetase)	0,313
Amphotericin B (Membranschäden)	0,391
Camptothecin (inhibiert Topoisomerase I bei Eukaryonten)	1,25
Cycloheximid (inhibiert Proteinsynthese an den Ribosomen)	0,391
Glycidol (Inhibitor der Triosephosphat-Isomerase in Glycolyse)	0,313 % (v/v)
Miconazol (hemmt Ergosterinsynthese)	6,25
N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (mutagen)	1,56
Nystatin (Membranschädigung)	3,13
Soraphen (hemmt Fettsäuresynthese)	1,56

Fortsetzung von Tab. 24

Antibiotika, gegen die <i>Hansenula</i> resistent war	MHK [ $\mu\text{g/ml}$ ]
Amethopterin (Folsäure-Antagonist, hemmt Thd-Synthese)	> 200
Antimycin A (hemmt Atmungskette, e <sup>-</sup> -Übergang von CoQ auf Cyt. c)	> 100
Benomyl (Inhibitor der P <sub>450</sub> -Monooxygenase)	62,5
Bleomycin (DNA-Strangbrüche)	> 100
Bromuracil (Thy-Antimetabolit)	> 100
Chelidonin (Mitosegift)	> 100
Cytosin-9- $\beta$ -D-Arabinofuranosid, (inhibiert dCMP-Desaminase)	> 100
Filipin (Membranschäden)	25
Fluoressigsäure (hemmt Citrat-Zyklus)	> 100
Griseofulvin (gegen Pilze mit chitinhaltiger Zellwand antimitotisch)	> 50
Hydroxyharnstoff (hemmt DNA-Synthese)	> 5.000
Kasugamycin (hemmt Melaninsynthese)	> 200
Melphalan (DNA-Schädigung, alkylierend)	> 500
Metronidazol (DNA-Schädigung)	> 100
Mitomycin C (DNA-Schädigung)	> 500
Physiostigmin (hemmt Acetylcholinesterase)	> 100

### 3.3 Energieladung

Die Energieladung des Adenylat-Systems (AEC) berechnet sich nach

$$\text{AEC} = \frac{[\text{ATP}] + 0,5[\text{ADP}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]}$$

und beschreibt den Energiezustand der Zellen [30].

30 min nach Ambruticin-Zugabe zeigte sich ein deutlicher Anstieg des ATP-Gehaltes, während die AMP-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle abnahm; die negativen Werte sind auf aufsummierte Fehler zurückzuführen (Abb. 27). Der ADP-Gehalt schwankte sehr stark, so daß hier kein zuverlässiger Trend zu erkennen war. Für die Energieladung ergab sich, daß dieser rasch auf 0,55 stieg, während er in der Kontrolle bei 0,4 verblieb (Abb. 27).



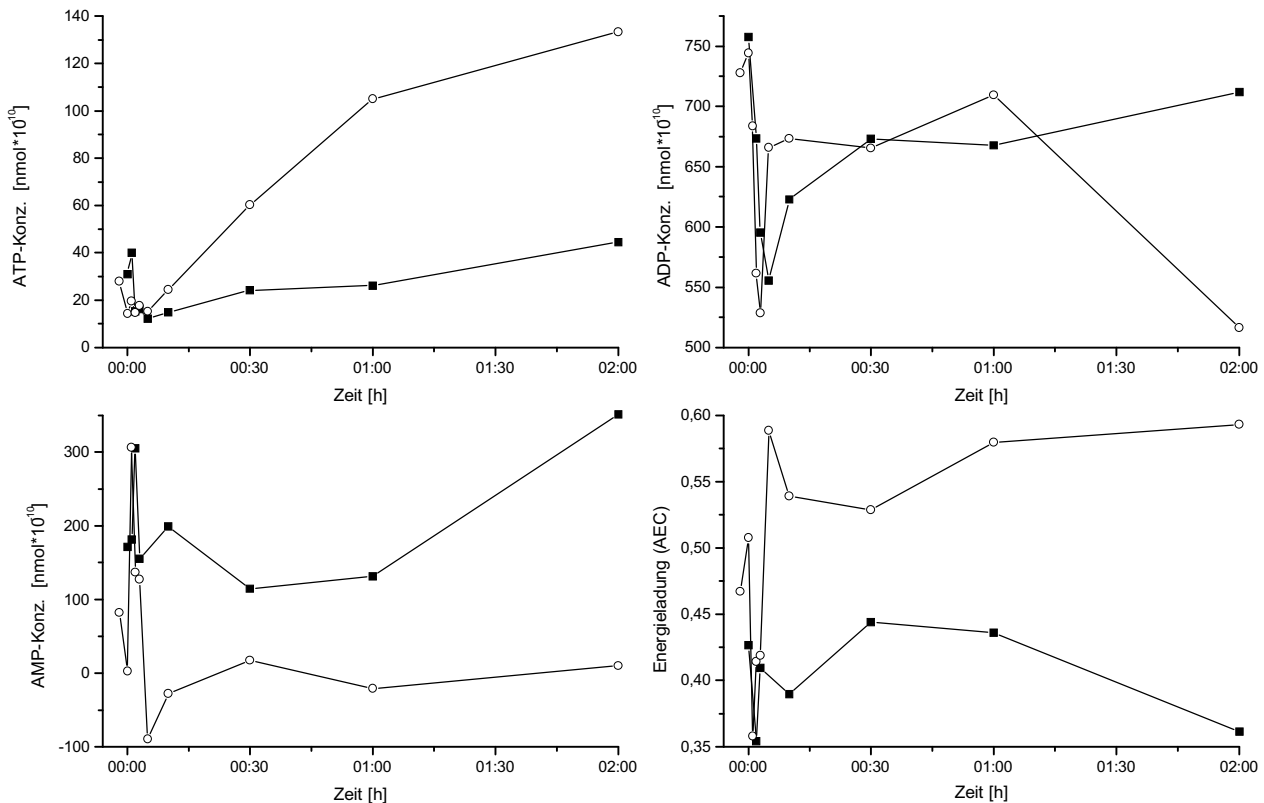


Abb. 27: Veränderung der intrazellulären ATP, ADP und AMP-Konzentration sowie der Energieladung (AEC) bei *H. anomala* nach Zugabe von 0,1 µg/ml Ambruticin (○) bzw. in der Kontrolle (■)

### 3.4 DNA als Informationsmatrix

#### 3.4.1 Wechselwirkung mit DNA

Für Ambruticin unterschied sich das berechnete UV-Spektrum der DNA mit Ambruticin (d) nicht von dem gemessenen Spektrum (b) von DNA mit Ambruticin (Abb. 28, ①). Dieses bedeutet, daß Ambruticin nicht mit den Basen der DNA in Wechselwirkung tritt. Von Ethidiumbromid ist bekannt, daß es in die DNA interkaliert und dementsprechend zeigte sich, daß sich das berechnete Spektrum (d) von dem gemessenen Spektrum von DNA mit Ethidiumbromid (b) unterschied (Abb. 28, ②).

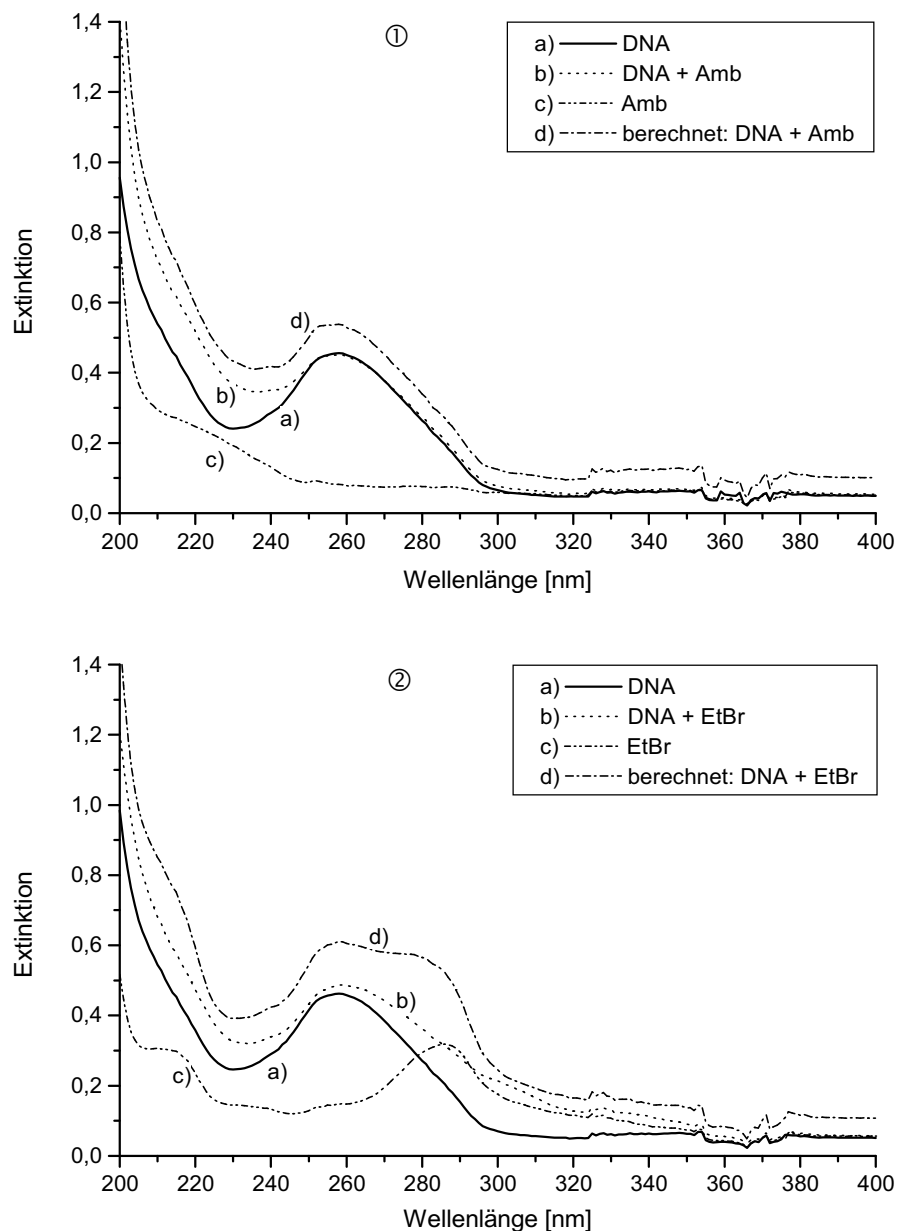


Abb. 28: Vergleich der gemessenen UV-Spektren von DNA mit Ambruticin (①) bzw. Ethidiumbromid (②) mit den berechneten Spektren aus DNA und Ambruticin bzw. Ethidiumbromid (EtBr)

### 3.4.2 DNA-Strangbrüche

Die Bahnen 2 und 5 in Abb. 29 zeigen, daß die DNA wie in der Kontrolle (Bahnen 1 und 4) keine Brüche aufweist, während in der Positivkontrolle (Bahnen 3 und 6) die DNA unspezifisch zu kleinen Bruchstücken zerlegt worden ist. Das bedeutet, daß das Ambruticin keine DNA-Strangbrüche verursacht wie N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (NTG).

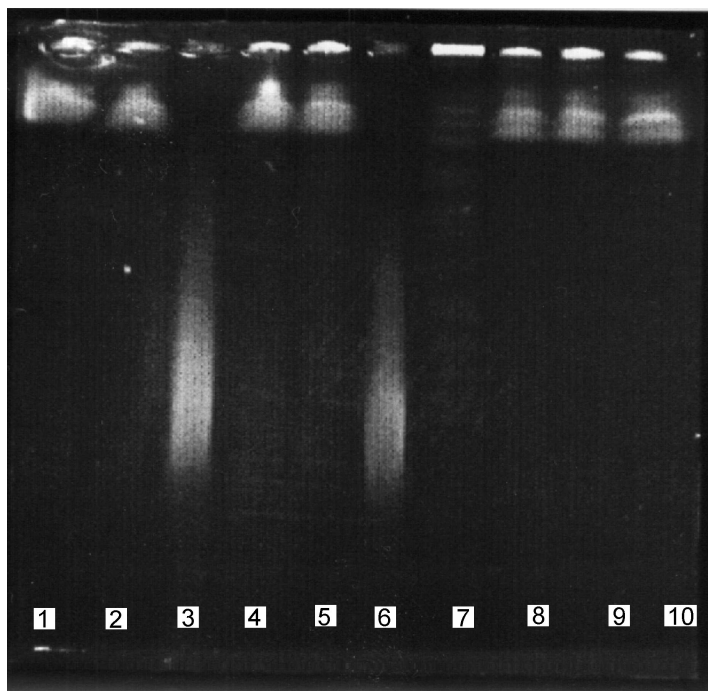


Abb. 29: Auftrennung der Chromosomen von *H. anomala* mittels Wechselfeld-Gelelektrophorese nach folgender Behandlung:

- 1, 2, 3: nach 1 h mit Methanol, Amb oder NTG
- 4, 5, 6: nach 3 h mit Methanol, Amb oder NTG
- 7: Chromosomen-Standard, *S. cerevisiae*
- 8, 9: nach 1 h mit Methanol oder Amb (*H. anomala* R<sup>Amb</sup>)
- 10: nach 3 h mit Amb (*H. anomala* R<sup>Amb</sup>)

### 3.5 Vorversuche zur Synthese von <sup>14</sup>C-Ambruticin

Mit den Vorversuchen sollten günstige Reaktionsbedingungen zur Methylierung von Ambruticin VS-4 zu Ambruticin VS-3 bzw. VS-1 mit Methyljodid herausgefunden werden. Als Ausgangsmaterial wurde das an der Aminogruppe einfach methylierte Ambruticin VS-4 verwendet und nicht das unmethylierte Ambruticin VS-5, da von letzterem nicht genügend Material zur Verfügung stand.

Mit dem <sup>14</sup>C-markierten Ambruticin könnte geklärt werden, ob Ambruticin von den Zellen verändert wird (z. B. Aktivmetabolisierung), an welcher Zielorganelle es bindet, nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine könnte das Zielmolekül lokalisiert, über Affinitätschromatographie das Zielenzym isoliert oder die Zielorganelle mittels Autoradiographie visualisiert werden.

#### 3.5.1 Unterschiedliche Konzentrationsverhältnisse

Ein 8facher Überschuß von Methyljodid scheint für die Ausbeute an methyliertem Ambruticin günstig zu sein. Stärker beeinflusste aber die Reaktionszeit die Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung Produkt, d. h., 3 h waren besser als 1 h (Abb. 30). Allerdings wäre ein 8facher Überschuß von <sup>14</sup>C-Methyljodid viel zu teuer.

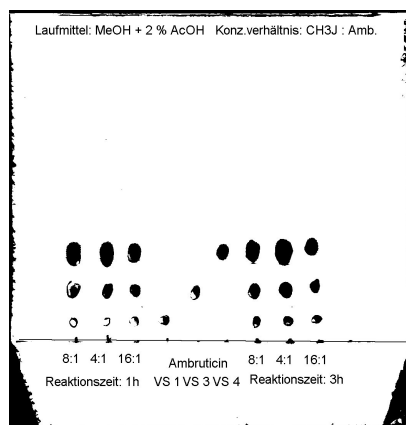


Abb. 30: DC-Lauf von umgesetztem Ambruticin VS-4 mit 4-, 8- und 16fachem  $\text{CH}_3\text{J}$ -Überschuß und Reaktionszeiten von 1 bzw. 3 h (Lösungsmittel: Ethanol)

### 3.5.2 Unterschiedliche Reaktionszeit

Da sich mit zunehmender Reaktionsdauer das Gleichgewicht in Richtung Zwischenprodukt (Ambruticin VS-3) und Produkt (Ambruticin VS-1) verschob, wurden die Reaktionszeiten deutlich verlängert. Nach 24 h Reaktionszeit war jedoch keine weitere Steigerung der Ausbeute zu erzielen (Abb. 31).

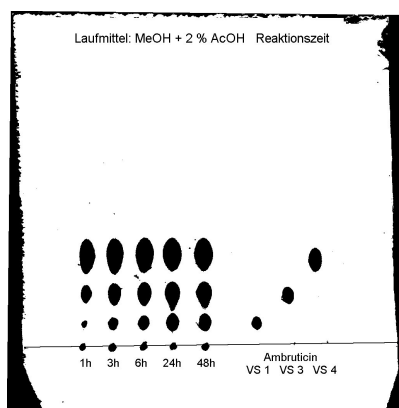


Abb. 31: DC-Lauf von umgesetztem Ambruticin VS-4 nach 1, 3, 6, 24 und 48 h Reaktionszeit bei 2,9fachem  $\text{CH}_3\text{J}$ -Überschuß (Lösungsmittel: Ethanol)

### 3.5.3 Unterschiedliche Lösungsmittel

In der Lösungsmittelreihe Methanol – Ethanol – Isopropanol verschob sich (bei 2,9fachem Methyljodidüberschuß) das Gleichgewicht immer mehr zugunsten des Zwischenproduktes bzw. des Produktes (Abb. 32), vermutlich weil das Methyljodid mit der zunehmend sterisch gehinderten alkoholischen Hydroxylgruppe weniger zum Methylether des entsprechenden Alkohols reagieren konnte.

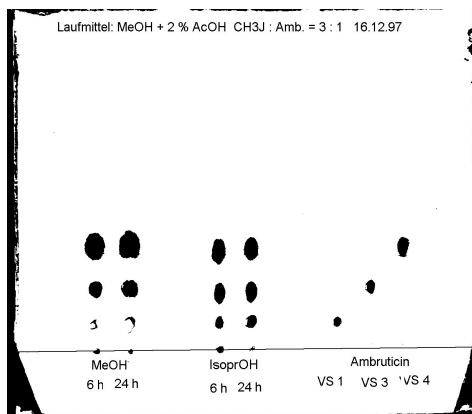


Abb. 32: DC-Lauf von umgesetztem Ambruticin VS-4 mit Methanol oder Isopropanol als Lösungsmittel nach 6 bzw. 24 h Reaktionszeit bei 2,9fachem CH<sub>3</sub>J-Überschuß

### 3.5.4 Unterschiedliche Konzentrationen II

Da das <sup>14</sup>C-Methyljodid die teure Komponente ist, wurden die Konzentrationsverhältnisse unter optimierteren Reaktionsbedingungen, also mit Isopropanol als Lösungsmittel und 24 h Reaktionszeit, zu Gunsten des Ambruticins verschoben. Es ergab sich aber, daß das Methyljodid im Überschuß eingesetzt werden muß, um eine genügende Ausbeute zu erzielen (Abb. 33).



Abb. 33: DC-Lauf von umgesetztem Ambruticin VS-4 mit einem 2:1; 1:1 und 1:2-Verhältnis CH<sub>3</sub>J/Ambruticin nach 24 h Reaktionszeit und Isopropanol als Lösungsmittel

### 3.5.5 Toxizitätstest

Der Toxizitätstest sollte zeigen, ob die gebildeten Nebenprodukte toxisch für die Zellen sind, um daraus ableiten zu können, wie aufwendig eine Reinigung durchgeführt werden müßte.

Tab. 25: Toxizität der Nebenprodukte sowie MHK-Bestimmung des umgesetzten Ambruticins

Lösungsmittel	Amb VS-4 Stammlösung	Umgesetztes Ambruticin	Umgesetztes Lösungsmittel (Nebenprodukte)
Methanol	MHK 0,313 µg/ml	MHK 0,25 µg/ml	keine Hemmung bei 5 % (v/v)
Ethanol	MHK 0,313 µg/ml	MHK 0,25 µg/ml	--
Isopropanol	MHK 0,313 µg/ml	MHK 0,25 µg/ml	keine Hemmung bei 5 % (v/v)

Die Nebenprodukte der Reaktion hatten bis 5 % (v/v) keinen toxischen Effekt auf *H. anomala* (Tab. 25). Die hohen MHK-Werte für das umgesetzte Ambruticin sowie des Ambruticins VS-4 ist auf die Methodik der 1:2-Verdünnungsschritte zurückzuführen (Tab. 25). Eine Aufreinigung wäre aber nötig, um die markierten Nebenprodukte sowie nicht umgesetztes Methyljodid aus dem Ansatz zu entfernen. Diese hätte mittels Destillation erfolgen können.

### 3.5.6 Ansatz zur Synthese von $^{14}\text{C}$ -Ambruticin

Die Synthese von  $^{14}\text{C}$ -Ambruticin hätte also nach folgenden Schema durchgeführt werden können: 0,007 mmol (= 3,5 mg) Ambruticin VS-4 und 0,02 mmol  $^{14}\text{C}$ -Methyljodid (= 1 mCi bei 50 mCi/ml) werden in 1–2 ml Isopropanol gelöst und für 24 h bei 60 °C umgesetzt; das Reaktionsgefäß muß fest verschlossen sein und es sollte ein möglichst kleiner Gasraum über dem Reaktionsansatz sein. Da keine weiteren Basen (Hünig-Base) bei der Reaktion eingesetzt werden, ist keine aufwendige Reinigung notwendig, es ist nur das überschüssige  $^{14}\text{C}$ -Methyljodid sowie das Lösungsmittel aus dem Ansatz zu entfernen. Die Reaktion verläuft nicht vollständig zum Ambruticin VS-1, so daß auch das Zwischenprodukt Ambruticin VS-3 gebildet werden würde und es verbliebe etwas Edukt Ambruticin VS-4 im Ansatz. Weil sich diese drei Ambruticin-Derivate in ihrer Toxizität nicht unterscheiden, wäre eine Trennung der Ambruticine nicht notwendig.

Die Synthese wurde letztlich nicht durchgeführt, weil hohen Kosten die Unsicherheit gegenüber stand, daß Ergebnisse wie die Identifizierung der Zielorganelle oder Isolierung des Zielenzymns nur bei einer hohen Bindungsaffinität zwischen Ambruticin und dem Zielmolekül gegeben wäre.

## 3.6 Biosynthesen mit $^{14}\text{C}$ -Präkursoren

### 3.6.1 DNA-Synthese mit $^{14}\text{C}$ -Adenin

Die DNA-Synthese konnte nicht mit dem spezifischen Präkursor  $^3\text{H}$ -Thymidin untersucht werden, da die Ambruticin-sensitiven Stämme *H. anomala* und *Ustilago maydis* kein Thymidin aufnehmen [62] und die Thymidin aufnehmenden Stämme wie *S. cerevisiae* oder *Rhodotorula glutinis* resistent gegen Ambruticin waren. Deshalb wurde die DNA-Synthese gemessen, indem  $^{14}\text{C}$ -Adenin in die Nucleinsäuren (RNA und DNA) eingebaut, die RNA alkalisch hydrolysiert und die verbleibende DNA mit Perchlorsäure ausgefällt wurde.

Abb. 34 zeigt, daß erst etwa 40 min nach Zugabe von 1,0 µg/ml Ambruticin zur Kultur von *H. anomala* die DNA-Synthese zum Erliegen kam, während sie in der Kontrolle weiter lief. Dieser späte Einfluß des Ambruticins auf die DNA-Synthese spricht für einen Sekundäreffekt.

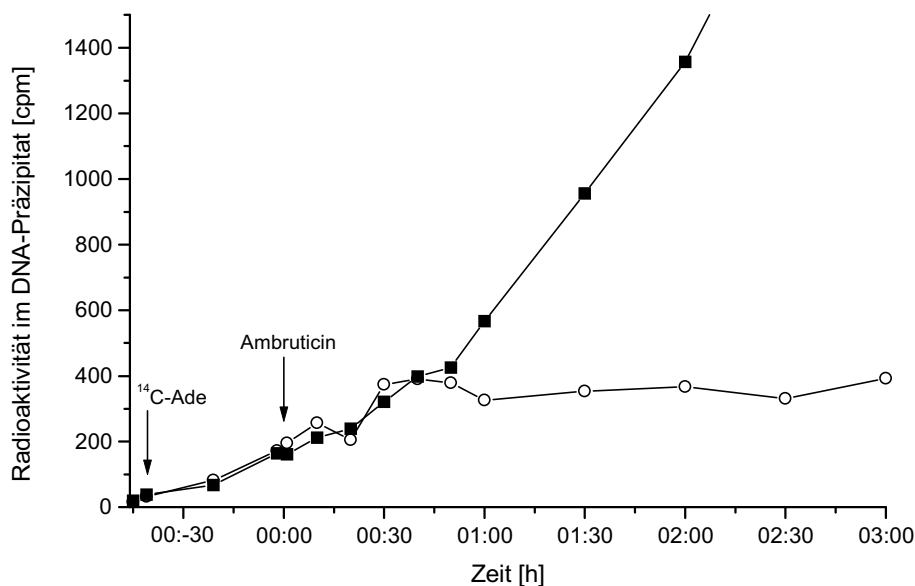


Abb. 34: Einfluß von 1,0 µg/ml Ambruticin (○) auf die DNA-Synthese bei *H. anomala* im Vergleich zur Kontrolle (■)

### 3.6.2 Nucleinsäuresynthese mit <sup>14</sup>C-Adenin

Gleichzeitig mit dem Ansatz zur Untersuchung der DNA-Synthese (2.9.1) wurde die Nucleinsäuresynthese (RNA und DNA) gemessen, indem das in die Nucleinsäuren eingebaute <sup>14</sup>C-Adenin mit TCA ausgefällt wurde.

Ähnlich wie die DNA-Synthese kommt auch die Nucleinsäuresynthese erst etwa 30 min nach Zugabe von 1,0 µg/ml Ambruticin zur Kultur von *H. anomala* zum Erliegen (Abb. 35). Die Nucleinsäuresynthese beinhaltet fast nur RNA-Synthese, da die RNA-Syntheserate etwa 10 mal höher lag als die DNA-Syntheserate. Das bedeutet, daß auch die RNA-Synthese nicht der primäre Wirkort des Ambruticins ist.

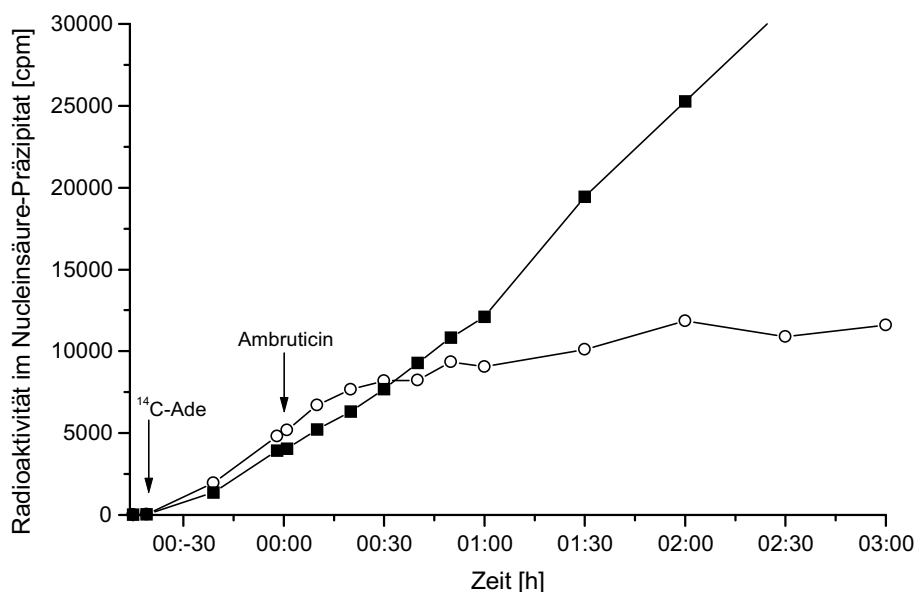


Abb. 35: Einfluß von 1,0 µg/ml Ambruticin (○) auf die Gesamt-Nucleinsäuresynthese bei *H. anomala* im Vergleich zur Kontrolle (■)

### 3.6.3 RNA-Synthese mit $^{14}\text{C}$ -Uracil

Die RNA-Synthese wurde auch direkt mit dem spezifischen Präkursor  $^{14}\text{C}$ -Uracil gemessen. Hierfür wurde die RNA mit dem eingebauten  $^{14}\text{C}$ -Uracil mit TCA ausgefällt.

Wie aus Abb. 36 hervorgeht, kam bei *H. anomala* auch die RNA-Synthese erst etwa 30 min nach Zugabe von 1,0 µg/ml Ambruticin zum Erliegen, was das Ergebnis der Nucleinsäuresynthese (vgl. 3.6.2) bestätigte.

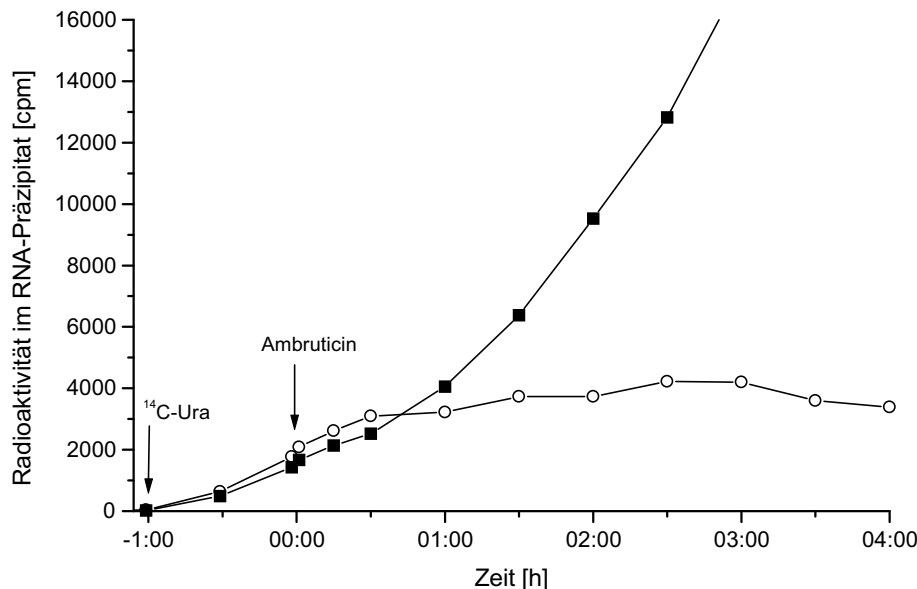


Abb. 36: Einfluß von 1,0 µg/ml Ambruticin (○) auf die RNA-Synthese bei *H. anomala* im Vergleich zur Kontrolle (■)

### 3.6.4 Proteinsynthese mit $^{14}\text{C}$ -Leucin

Die Proteinbiosynthese wurde mit dem Präkursor  $^{14}\text{C}$ -Leucin verfolgt, indem die markierten Proteine mit TCA ausgefällt wurden. Als Positivkontrolle diente Cycloheximid, das die Proteinsynthese an den Ribosomen inhibiert.

Abb. 37 veranschaulicht den Unterschied zwischen einem Primär- und einem Sekundäreffekt: Während die Proteinsynthese noch 40 min nach Ambruticin-Zugabe (1,0 µg/ml) parallel zur Kontrolle verlief und erst danach gestoppt wurde, wurde die Proteinsynthese nach der Zugabe von Cycloheximid sofort inhibiert (Primäreffekt). Allerdings wurde *H. anomala* durch Ambruticin wesentlich schneller abgetötet als durch Cycloheximid; 4 h nach Ambruticin-Zugabe sank die KBE/ml von  $10^7$  auf  $10^4$  während sie im gleichen Zeitraum nach Cycloheximid-Zugabe kaum abnahm.



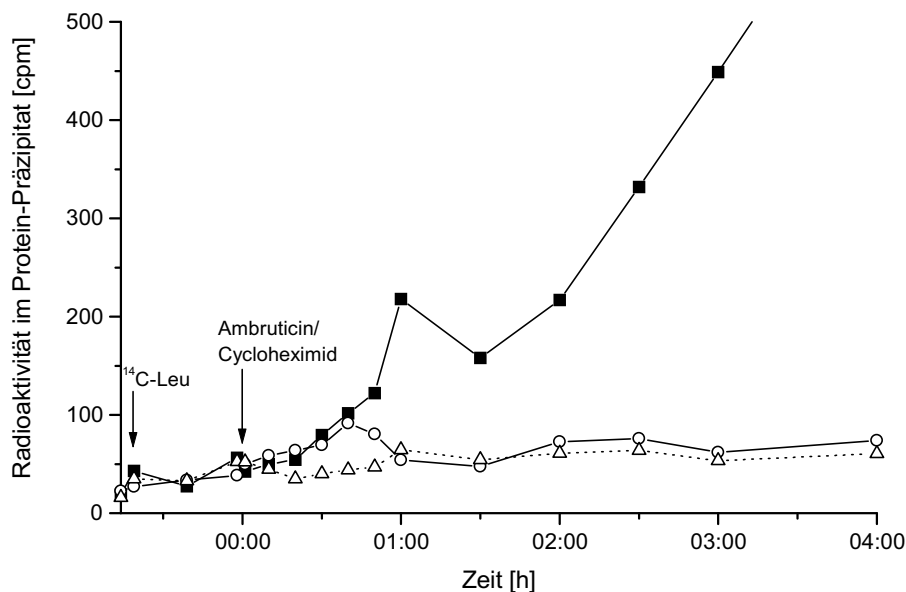


Abb. 37: Einfluß von 1,0 µg/ml Ambruticin (○) bzw. Cycloheximid (△) auf die Proteinsynthese bei *H. anomala* im Vergleich zur Kontrolle (■)

### 3.6.5 Lipidsynthese mit $^{14}\text{C}$ -Acetat

Die Lipidsynthese wurde als Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Acetat in TCA-ausfällbare Polymere gemessen. Auch die Lipidsynthese kam bei *H. anomala* spät zum Erliegen - erst 50 min nach Zugabe von 1,0 µg/ml Ambruticin wurde die Lipidsynthese gestoppt während sie in der Kontrolle weiterlief (siehe Abb. 38). Auch die Lipidsynthese ist nicht der primäre Wirkort des Ambruticins.

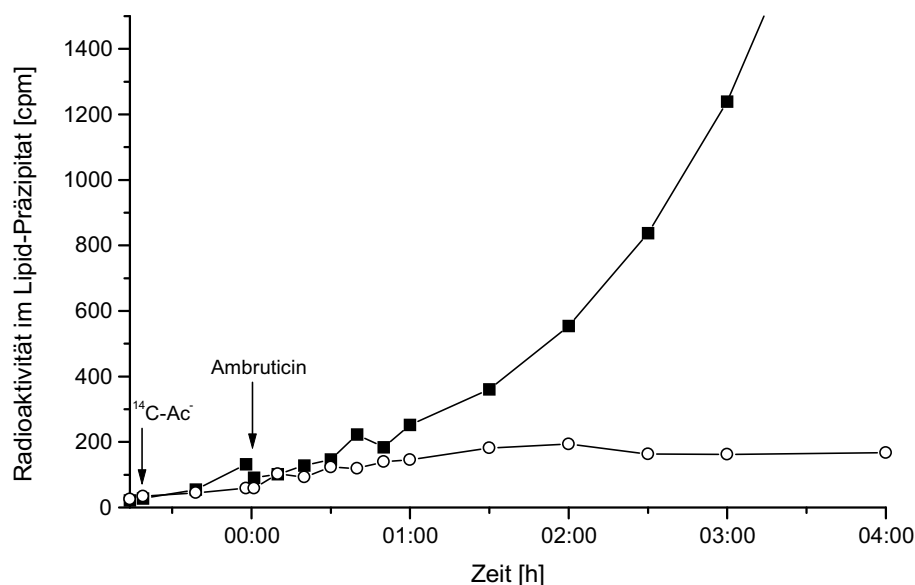


Abb. 38: Einfluß von 1,0 µg/ml Ambruticin (○) auf die Lipidsynthese bei *H. anomala* im Vergleich zur Kontrolle (■)

Wenn nur 0,1 µg/ml Ambruticin eingesetzt wurden, wurde die Lipidsynthese erst nach 2 h inhibiert (Abb. 39).

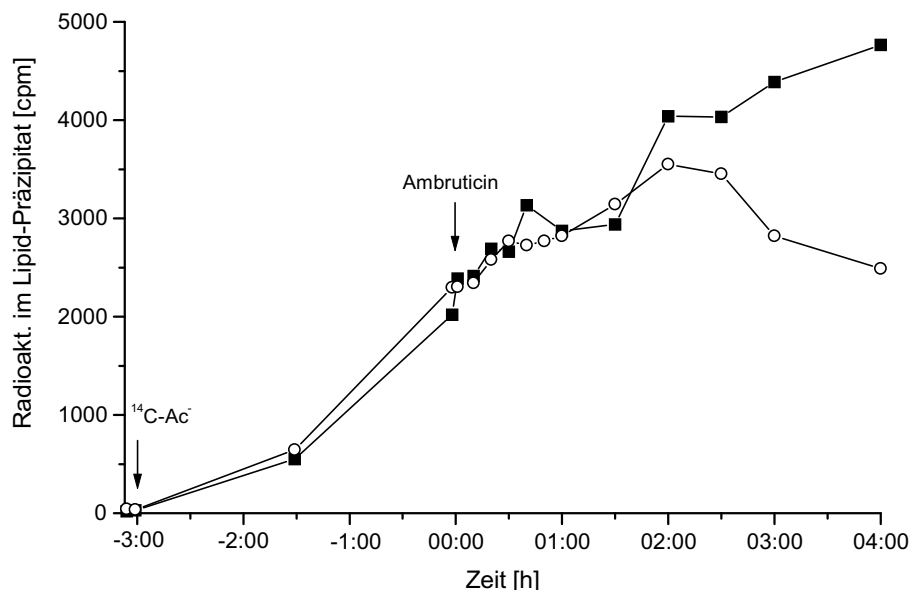


Abb. 39: Lipidsynthese nach Zugabe von 0,1 µg/ml Ambruticin (○) zur Kultur von *H. anomala* im Vergleich zur Kontrolle (■)

Abb. 40 zeigt vergleichend in welchen Fraktionen das  $^{14}\text{C}$ -Acetat verblieb: Gesamt - 120 min zeigt die eingesetzte Radioaktivität zu Beginn des Versuches, Gesamt + 240 min ist die im Ansatz verbliebene Radioaktivität am Ende des Versuches. Diese war in der Kontrolle deutlich niedriger als in der Probe, d.h., in der Kontrolle wurde binnen 4 h mehr Acetat als in der Probe veratmet. Im Überstand war der Unterschied zwischen Kontrolle und Probe noch deutlich größer. Die Differenz zwischen Gesamt und Überstand beschreibt die in den Zellen akkumulierte Radioaktivität (Gesamt-Lipidsynthese) - die Kontrollzellen hatten binnen 4 h etwa dreimal soviel  $^{14}\text{C}$ -Acetat inkorporiert als die mit Ambruticin behandelten Zellen. Wurde dieser Lipidextrakt mit wässrigen Lösungen gewaschen, so wurden damit aus den Kontrollansätzen verstärkt polare Metabolite entfernt. Dabei dürfte es sich zum einen um an den Zellen verbliebenes  $^{14}\text{C}$ -Acetat handeln (vor allem in der ersten Waschlösung), aber auch um polare Lipide wie Glycolipide und Phospholipide (in den weiteren Waschlösungen). In dem verbliebenen gewaschenen Lipidextrakt befanden sich nun vor allem apolare Lipide und hier hatte sich nun das Verhältnis (auf niedrigem Niveau) umgekehrt: In den mit Ambruticin behandelten Zellen waren etwa doppelt so viele markierte apolare Lipide wie in der Kontrolle. Allerdings konnten die Zellen in der Kontrolle 4 h länger wachsen als die mit Ambruticin behandelten Zellen und dieses Wachstum wurde bei den Analysewerten nicht berücksichtigt. Die Summe der Radioaktivität aus den Waschlösungen und dem Lipidextrakt stimmt in guter Näherung mit der in den Zellen inkorporierten Radioaktivität überein.

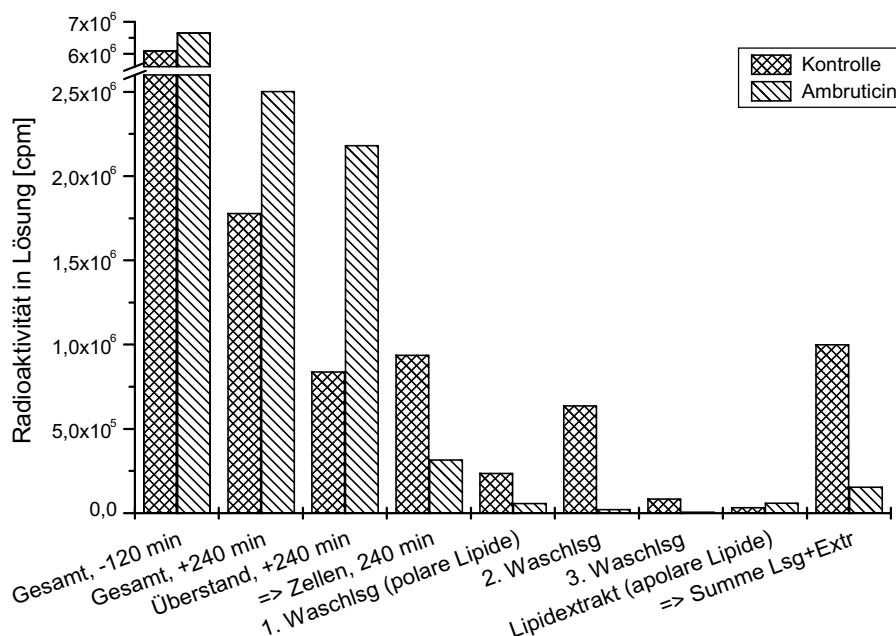


Abb. 40: Bilanzierung des <sup>14</sup>C-Acetateinbaus in den einzelnen Fraktionen: Radioaktivität im Ansatz zu Beginn des Versuches (Gesamt - 120 min), 240 min nach Ambruticin-Zugabe (Gesamt + 240 min), im Kulturüberstand nachdem die Zellen abzentrifugiert worden sind (Überstand + 240 min) und in die Zellen inkorporierte Radioaktivität (berechnet als Differenz: Zellen 240 min). Die Lipide wurden aus den Zellen extrahiert und das Extraktionsmittel dreimal mit wäßrigen Lösungen gewaschen (1.-3. Waschlsg); danach verblieb der gewaschene Lipidextrakt (Lipidextrakt). Bei den Berechnungen wurde keine Wachstumskorrektur durchgeführt, d.h., es wurde nicht berücksichtigt, daß die Zellen der Kontrolle weitergewachsen waren, während sie in der Probe sich nicht mehr vermehrten.

### 3.6.6 Polymersynthese mit <sup>14</sup>C-Glycerin

Im Glycerin-Stoffwechsel wird üblicherweise das Glycerin durch die Glycerin-Kinase mit ATP zu Glycerin-3-phosphat phosphoryliert. Von hier aus stehen nun zwei Wege zur Verfügung: Glycerin-3-phosphat kann durch die mitochondriale Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase zu Dihydroxyacetonphosphat oxidiert und anschließend in der Glycolyse metabolisiert werden oder Glycerin-3-phosphat wird direkt in die Lipidsynthese geschleust: Eine mitochondriale Acyltransferase bildet mit Acyl-CoA die Lysophosphatidsäure, die mit einer weiteren Acyltransferase und Acyl-CoA zur Phosphatidsäure acyliert wird. Die Phosphatidsäure kann in die Phospholipid- oder Triacylglyceridsynthese gelangen.

Aus Abb. 41 geht hervor, daß die Acylglyceridsynthese aus (externem) Glycerin - im Gegensatz zur Lipidsynthese aus Acetat (vgl. 3.6.5) - nach 30 min gestoppt wurde.

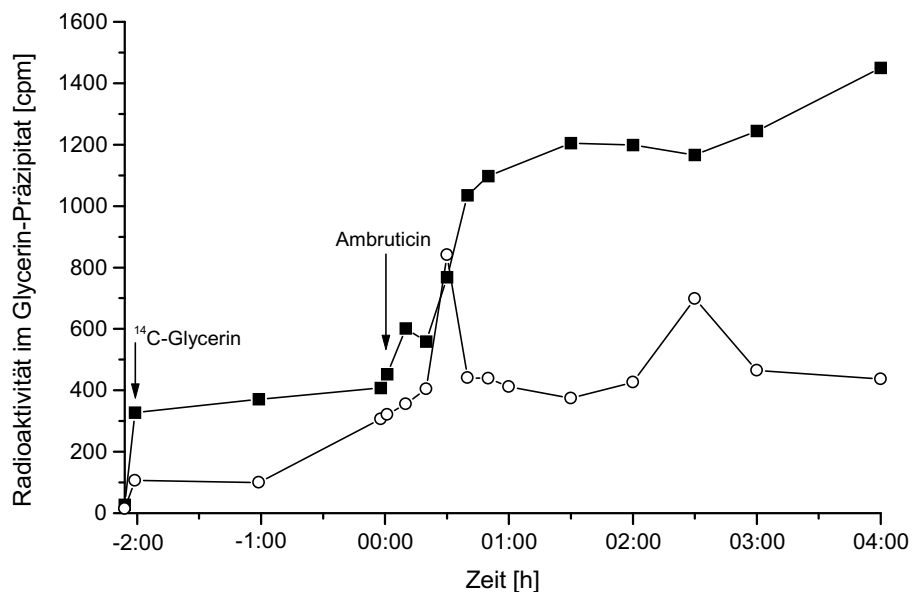


Abb. 41: Polymersynthese von *H. anomala* mit  $^{14}\text{C}$ -Glycerin nach Zugabe von  $1,0\text{ }\mu\text{g/ml}$  Ambruticin (○) im Vergleich zur Kontrolle (■)

### 3.6.7 Synthese der Phospholipide und Sphingolipide mit $^3\text{H}$ -Inosit

Abb. 42 zeigt, daß der Inosit-Einbau etwa 40 min nach Zugabe von  $1,0\text{ }\mu\text{g/ml}$  Ambruticin beendet wurde.

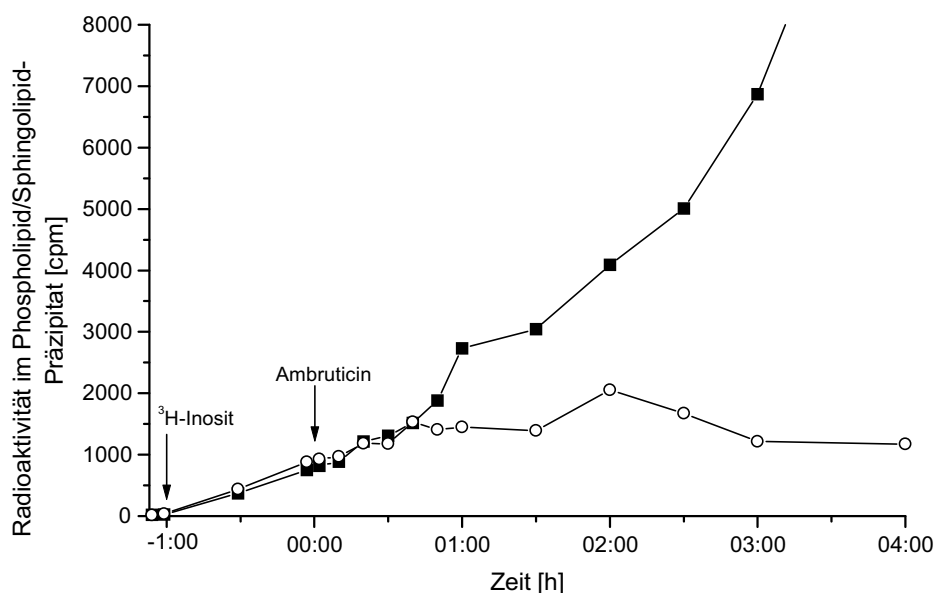


Abb. 42:  $^3\text{H}$ -Inosit-Einbau (Phospholipide und Sphingolipide) nach Zugabe von  $1,0\text{ }\mu\text{g/ml}$  Ambruticin (○) im Vergleich zur Kontrolle (■)

Wurde beim Inosit-Einbau zwischen den (alkalisch stabilen) Sphingolipiden und Phospholipiden unterschieden, so zeigte sich, daß die Phospholipidsynthese nach etwa 40 min und die Sphingolipidsynthese nach etwa 50 min gestoppt wurde (Abb. 43).

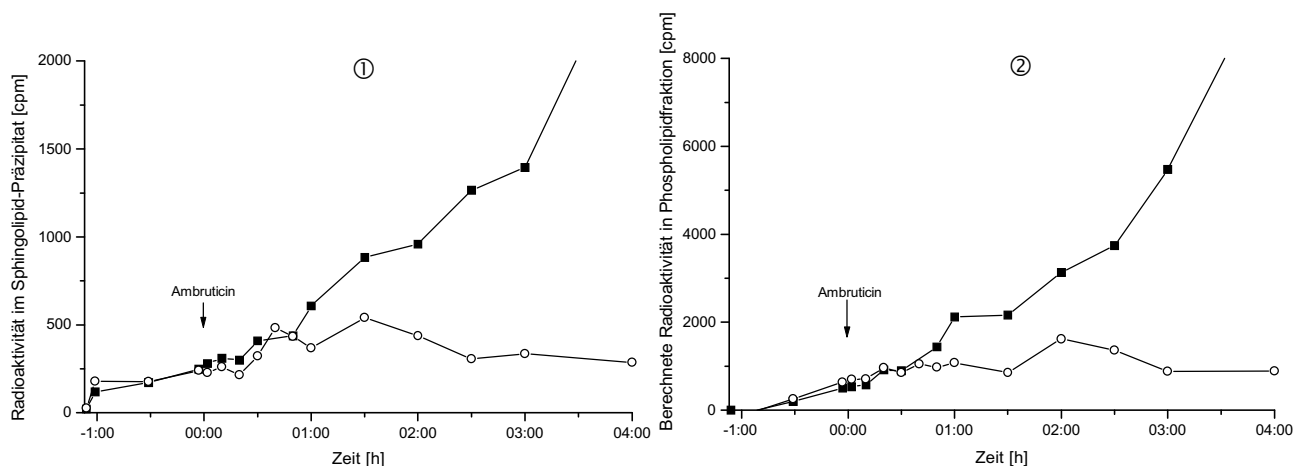


Abb. 43:  $^3\text{H}$ -Inosit-Einbau differenziert in ① Sphingolipidsynthese und ② (berechnete) Phospholipidsynthese (= Gesamteinbau – Sphingolipideinbau) nach Zugabe von  $1,0 \mu\text{g/ml}$  Ambruticin (○) und Kontrolle (■)

Die Synthese der polareren Lipide wurde nach 40 – 50 min gestoppt, also ähnlich wie die Synthese der apolaren Lipide (vgl. Abb. 38).

### 3.6.8 Polymersynthese aus $^{14}\text{C}$ -Pyruvat

Die Polymersynthese aus Pyruvat beschreibt die Stoffwechselaktivität des Citrat-Zykluses. Aus Abb. 44 geht hervor, daß der Citrat-Zyklus als Pool für Metabolite noch 30 min nach Zugabe von  $1,0 \mu\text{g/ml}$  Ambruticin den Zellen zur Verfügung stand, danach aber zusammenbrach.

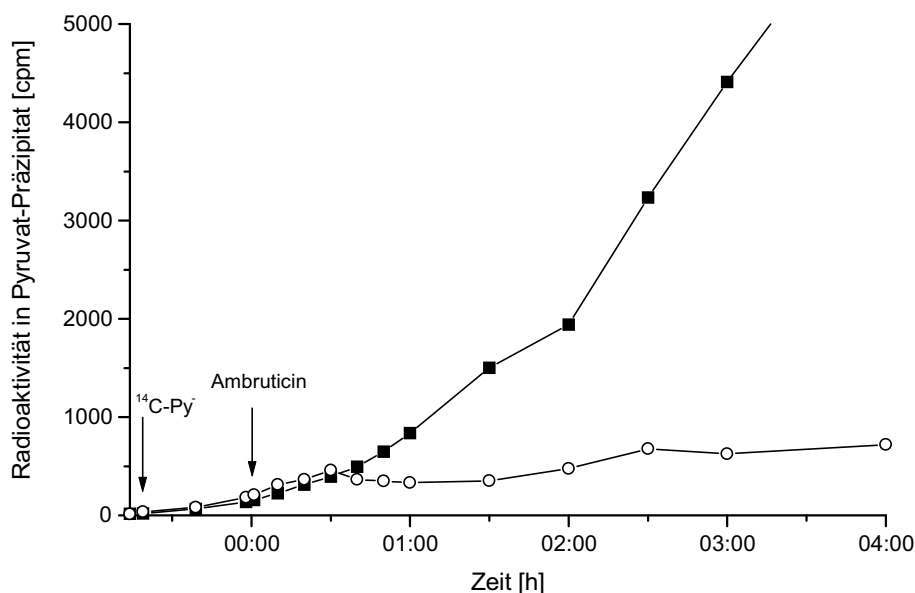


Abb. 44: Polymersynthese mit  $^{14}\text{C}$ -Pyruvat nach Zugabe von  $1,0 \mu\text{g/ml}$  Ambruticin (○) im Vergleich zur Kontrolle (■)

### 3.6.9 Polymersynthese und CO<sub>2</sub>-Freisetzung aus U-<sup>14</sup>C-Glucose

Bis zu 50% der Zucker im Medium kann *Hansenula* zur Zellwandsynthese verwenden [69]. Die Polymersynthesen aus Glucose wurden durch 1,0 µg/ml Ambruticin erst nach 1 – 1,5 h inhibiert (Abb. 45).

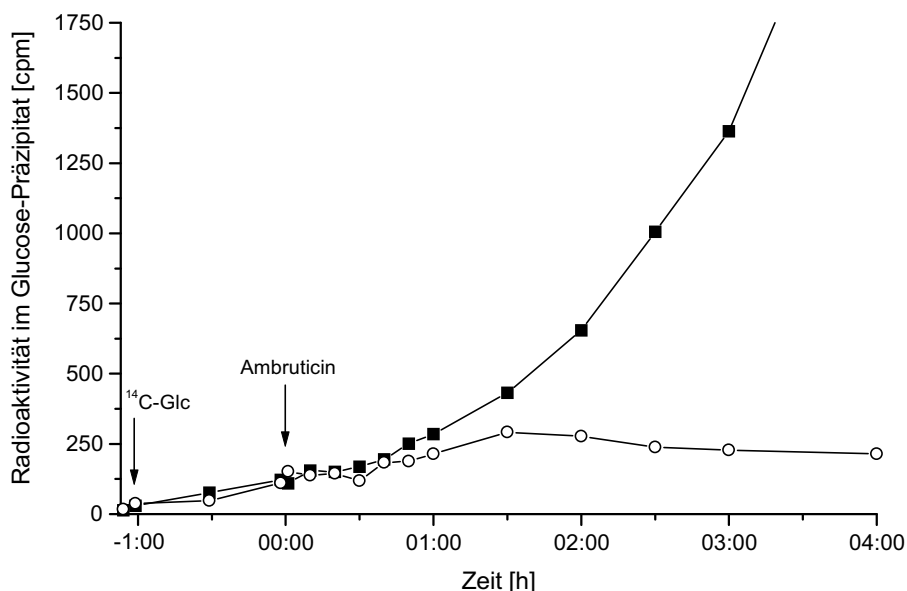


Abb. 45: Polymersynthese (vor allem Zellwandsynthese) mit <sup>14</sup>C-Glucose nach Zugabe von 1,0 µg/ml Ambruticin (○) im Vergleich zur Kontrolle (■)

Die CO<sub>2</sub>-Produktion aus Glucose wurde durch 1,0 µg/ml Ambruticin erst nach 2 h gestoppt und mit 0,05 µg/ml Ambruticin kam sie erst nach 4 h (fast) vollständig zum Erliegen, während sie in der Kontrolle über diesen Zeitraum exponentiell anstieg (Abb. 46).

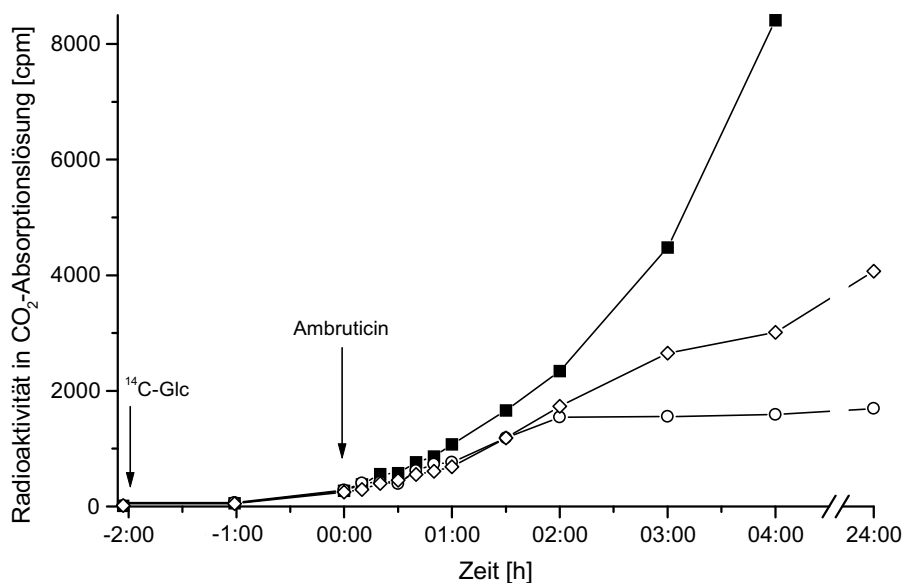


Abb. 46: CO<sub>2</sub>-Freisetzung aus <sup>14</sup>C-Glucose nach Zugabe von 0,05 µg/ml (◇) bzw. 1,0 µg/ml (○) Ambruticin im Vergleich zur Kontrolle (■)

### 3.6.10 Zellwandsynthese und Glycoproteine mit $^{14}\text{C}$ -Mannose

Da Hefen sich in den Zellwänden von den anderen, resistenten Gruppen, wie Bakterien und tierische Zelllinien, aber auch untereinander unterscheiden, wäre hier ein potentieller Wirkort, der auch die spezifische Aktivität des Ambruticins erklären könnte. Allerdings wurde auch die Zellwandsynthese durch 1,0  $\mu\text{g/ml}$  Ambruticin erst nach 1,5 h gestoppt (Abb. 47).

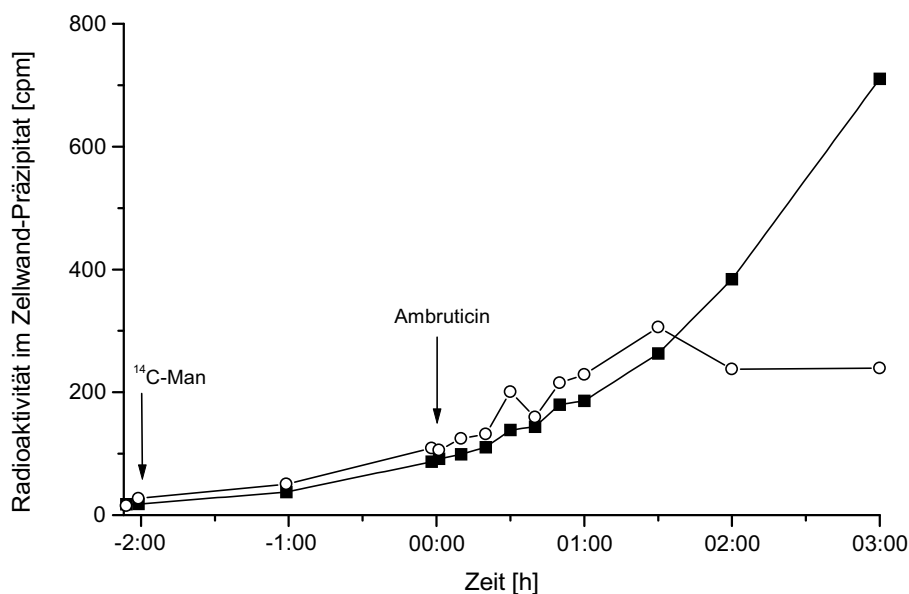


Abb. 47: Zellwandsynthese mit  $^{14}\text{C}$ -Mannose nach Zugabe von 1,0  $\mu\text{g/ml}$  Ambruticin (○) im Vergleich zur Kontrolle (■)

### 3.6.11 Zellteilung mit $^{14}\text{C}$ -N-Acetylglucosamin

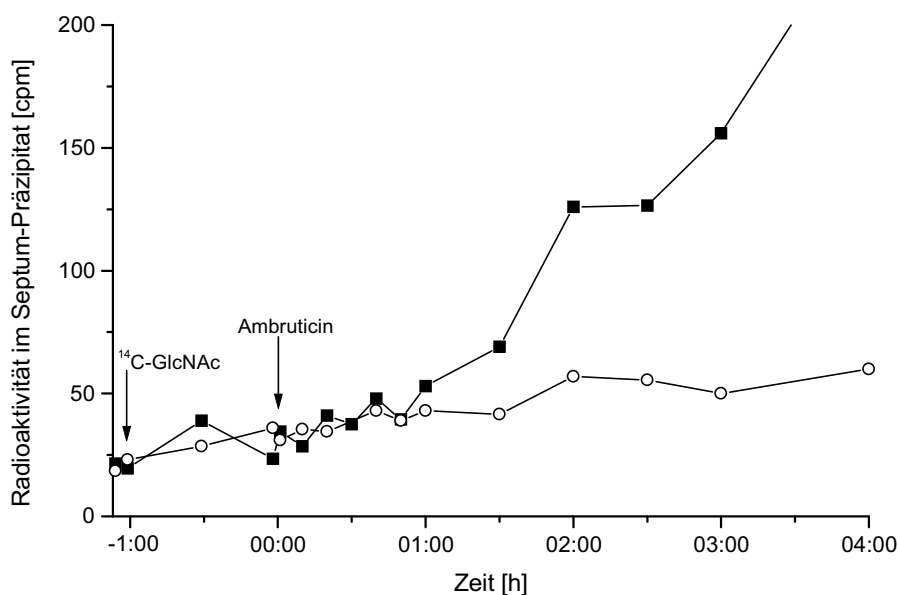


Abb. 48: Zellteilung als Septumsynthese mit  $^{14}\text{C}$ -N-Acetylglucosamin nach Zugabe von 1,0  $\mu\text{g/ml}$  Ambruticin (○) im Vergleich zur Kontrolle (■)

Chitin ( $\beta$ -1 $\rightarrow$ 4 N-Acetylglucosamin) bilden Hefen als Spetum zwischen sich teilenden Zellen [40], die Zellwände selber bestehen bei *Hansenula* primär aus Phosphomannan [69].

Etwa 1 h nach Zugabe von 1,0  $\mu\text{g/ml}$  Ambruticin zeigten sich Unterschiede beim Einbau von N-Acetylglucosamin im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 48). Da die Einbauraten insgesamt sehr niedrig waren, ist kaum zu beurteilen, ob nach Ambruticin-Zugabe noch eine Zellteilung stattgefunden hat.

### 3.6.12 Zellpermeabilität mit $^{14}\text{C}$ -Isoaminobutyrat

Isoaminobuttersäure ist eine Aminosäure, die leicht von Zellen aufgenommen wird, aber nicht verstoffwechselt werden kann. Somit akkumuliert sie in den Zellen und wird, wenn diese permeabel werden, freigesetzt. Abb. 49 zeigt, daß *H. anomala* 45 min nach Zugabe von 0,1  $\mu\text{g/ml}$  Ambruticin deutlich Radioaktivität ins Medium abgab. Bei der Positivkontrolle mit 30  $\mu\text{g/ml}$  Amphotericin B begann die Freisetzung bereits nach 15 min. Wurden die Zellen jedoch unter stoffwechselinaktiven Bedingungen kultiviert, also bei 0 °C in Minimalmedium oder bei 30 °C in Glucose-freiem Tris-Puffer, konnte auch 4 h nach Zugabe von 1,0  $\mu\text{g/ml}$  Ambruticin keinerlei Freisetzung von Radioaktivität nachgewiesen werden. Die Kontrolle ohne Ambruticin sowie die Resistenzmutante *H. anomala*  $R^{\text{Amb}}$  mit 10,0  $\mu\text{g/ml}$  Ambruticin zeigten über 4 h eine leichte Freisetzung von Radioaktivität, was vermutlich auf Zellteilungsprozesse zurückzuführen ist.

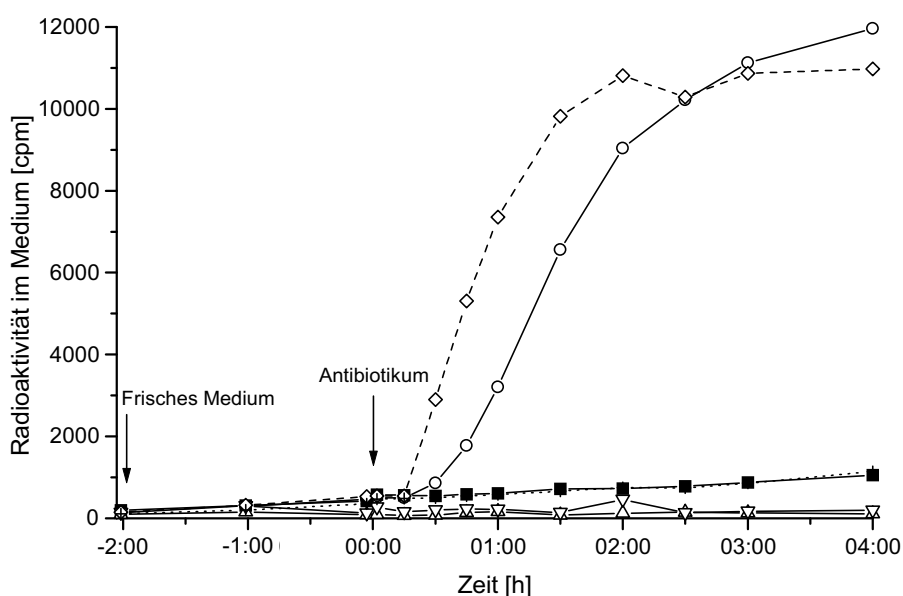


Abb. 49: Freisetzung von akkumuliertem  $^{14}\text{C}$ -Isoaminobutyrat von *H. anomala* nach Zugabe von 0,1  $\mu\text{g/ml}$  Ambruticin (○), 1,0  $\mu\text{g/ml}$  in Puffer (△) oder in Minimalmedium bei 0 °C (▽). Kontrolle ohne Ambruticin (■), Resistenzmutante mit 10,0  $\mu\text{g/ml}$  (+) und Positivkontrolle mit 30,0  $\mu\text{g/ml}$  Amphotericin B (◇)

Abb. 50 zeigt, daß auch Pyrrolnitrin Membranschäden verursachte, so daß Radioaktivität ins Medium abgegeben wurde. Dieser Effekt trat jedoch nicht wie bei Ambruticin nach 45 min



sondern etwas später, nach etwa 1 h auf. Wurde *H. anomala* in Puffer unter stoffwechselinaktiven Bedingungen kultiviert, so setzten die Zellen auch bei 4-stündiger Behandlung mit 0,1 µg/ml Pyrrolnitrin keine Radioaktivität frei.

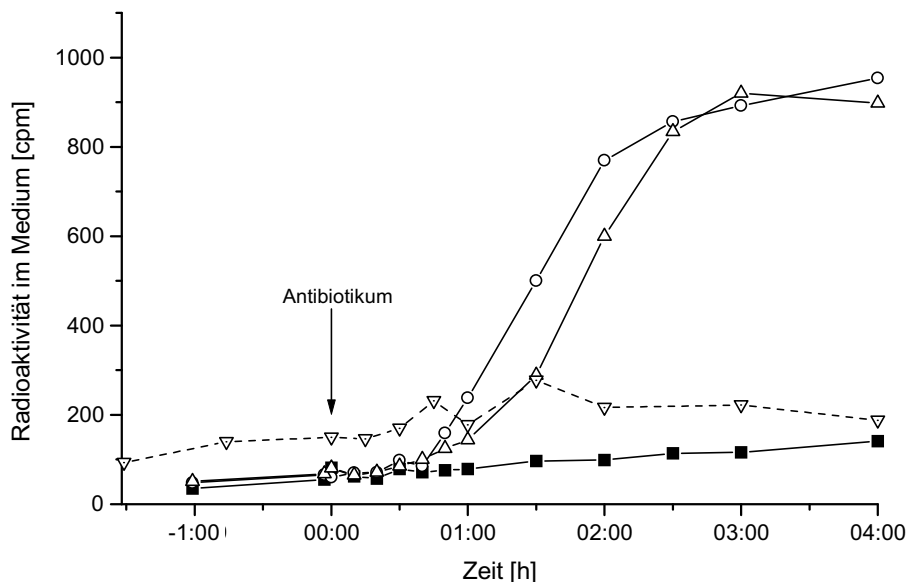


Abb. 50: Zellpermeabilität bei *H. anomala* mit  $^{14}\text{C}$ -Isoaminobutyrat: Zugabe von 1,0 µg/ml (○) Ambruticin, 0,5 µg/ml Pyrrolnitrin (Δ) bzw. 0,1 µg/ml Pyrrolnitrin in Puffer (▽) im Vergleich zur Kontrolle (■)

### 3.6.13 Fazit

Alle untersuchten Biosynthesen liefen binnen 0,5 – 2 h aus - dieses deutete auf Sekundäreffekte hin: Die Zellen starben ab, so daß die Biosynthesen gestoppt wurden. Bei einem Primäreffekt würde man erwarten, daß die Wirkung rasch eintritt, die Zellen müßten dann nicht unbedingt rasch absterben, wie das z. B. auch mit Soraphen nicht geschieht [52].

## 3.7 Glycerin

### 3.7.1 Glycerin-Bestimmung mittels HPLC

Abb. 51 zeigt, daß nach Zugabe von 0,1 µg/ml Ambruticin bzw. Pyrrolnitrin *H. anomala* sehr schnell intrazellulär Glycerin akkumulierte. Im Gegensatz zu den mit Pyrrolnitrin behandelten Zellen nahm der intrazelluläre Glyceringehalt bei den mit Ambruticin behandelten Zellen nach 2 h deutlich ab.

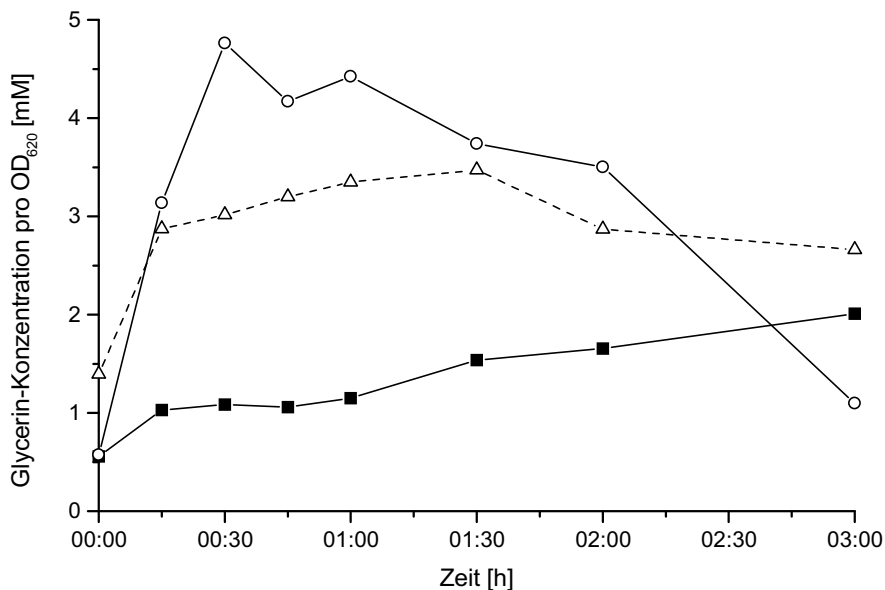


Abb. 51: Intrazelluläre Glycerinakkumulation bei *H. anomala* nach Zugabe von 0,1 µg/ml Ambruticin (○), 0,1 µg/ml Pyrrolnitrin (△) und bei der Kontrolle (■). Gemessen mittels HPLC

Die Veränderung des Mediums - Abnahme der Glucose sowie Zunahme von Ethanol - veranschaulicht Abb. 52:

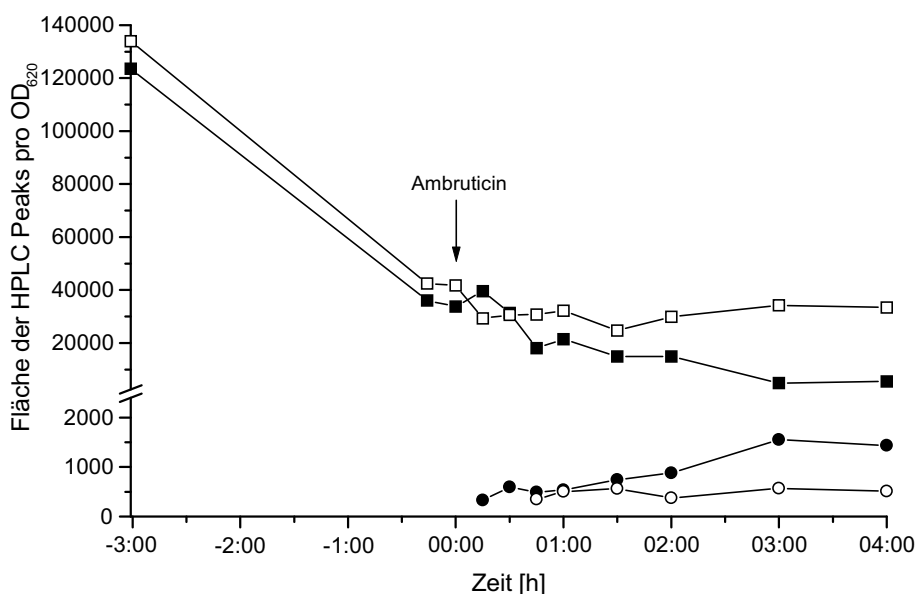


Abb. 52: Veränderung des Minimalmediums während der Kultivierung, die Werte sind wachstumskorrigiert: Glucose (□/■) und Ethanol (○/●) mit 0,1 µg/ml Ambruticin bzw. bei der Kontrolle

### 3.7.2 Enzymatische Glycerin-Bestimmung

Auch mit dem enzymatischen Nachweis konnte gezeigt werden, daß die Zellen nach Behandlung mit 0,1 µg/ml Ambruticin sehr schnell intrazellulär Glycerin akkumulierten, und es zeigte sich ebenfalls, daß der Glyceringehalt nach 2 h wieder sank (Abb. 53). Mit 0,1 µg/ml

Pyrrolnitrin konnte eine Abnahme des intrazellulären Glyceringehaltes binnen 4 h nicht nachgewiesen werden.

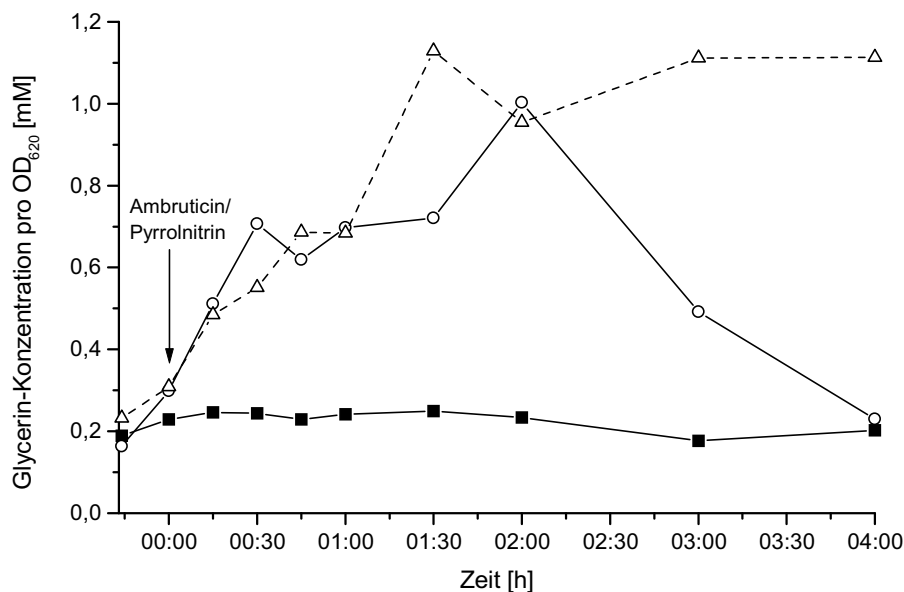


Abb. 53: Intrazelluläre Glycerinakkumulation bei *H. anomala* nach Zugabe von 0,1 µg/ml Ambruticin (○), 0,1 µg/ml Pyrrolnitrin (△) und bei der Kontrolle (■). Enzymatische Messung

### 3.7.3 Glycerin-Nachweis mit <sup>14</sup>C-Glucose

Abb. 54 zeigt die Radioaktivität in den einzelnen, aufgetrennten HPLC-Fractionen. Bei  $R_f$  12,3 min lief das markierte Glycerin, bei  $R_f$  4–6 min befanden sich markierte phosphorylierte Metabolite. Die Abb. 54 ist wachstumskorrigiert, allerdings mit  $OD_{620}$ -Meßwerten, die von Kulturen in Minimalmedium gewonnen wurden.

Aus diesen Abbildungen wird ersichtlich, daß das Ambruticin zu einer sehr schnellen Akkumulation von markiertem Glycerin führt, während andere Metabolite aus Glucose nicht davon betroffen waren. Im Glucose-freien Casamino acid-Medium war die erzielte Markierung des Glycerins viel höher als im Glucose-reduzierten Minimalmedium, da in letzterem die Glycerinsynthese aus unmarkierter Glucose nicht miterfaßt wurde.

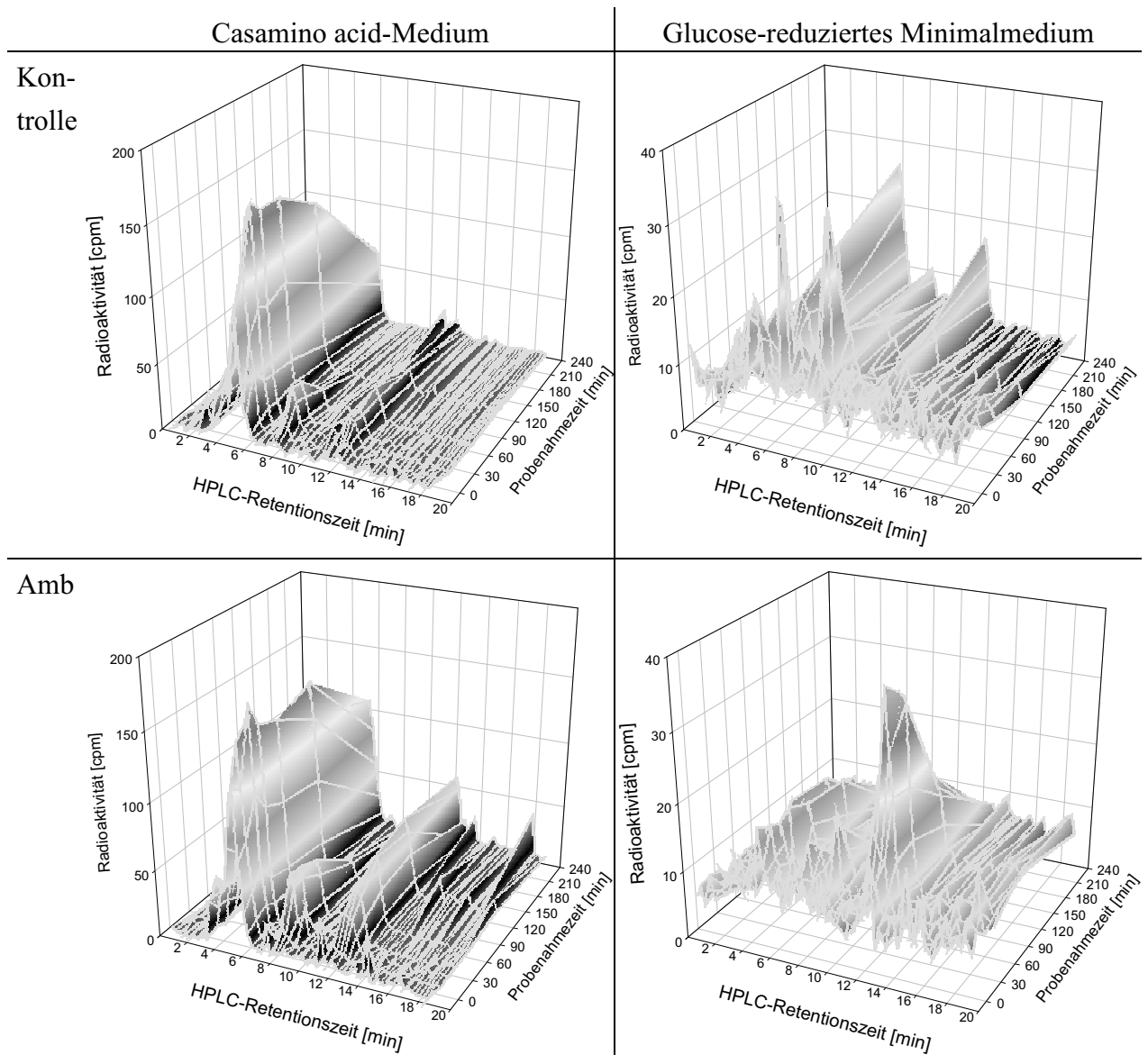


Abb. 54: HPLC-Läufe der  $^{14}\text{C}$ -Glucose-markierten Zellextrakte von *H. anomala*, kultiviert in Glucose-freiem Casamino acid-Medium bzw. Glucose-reduziertem Minimalmedium

Abb. 55 veranschaulicht besser die rasche Glycerin-Akkumulation aus  $^{14}\text{C}$ -markierter Glucose nach Zugabe von  $0,1 \mu\text{g/ml}$  Ambruticin. Es konnte ebenfalls bestätigt werden, daß etwa 2 h später der intrazelluläre Glyceringehalt wieder abnahm.

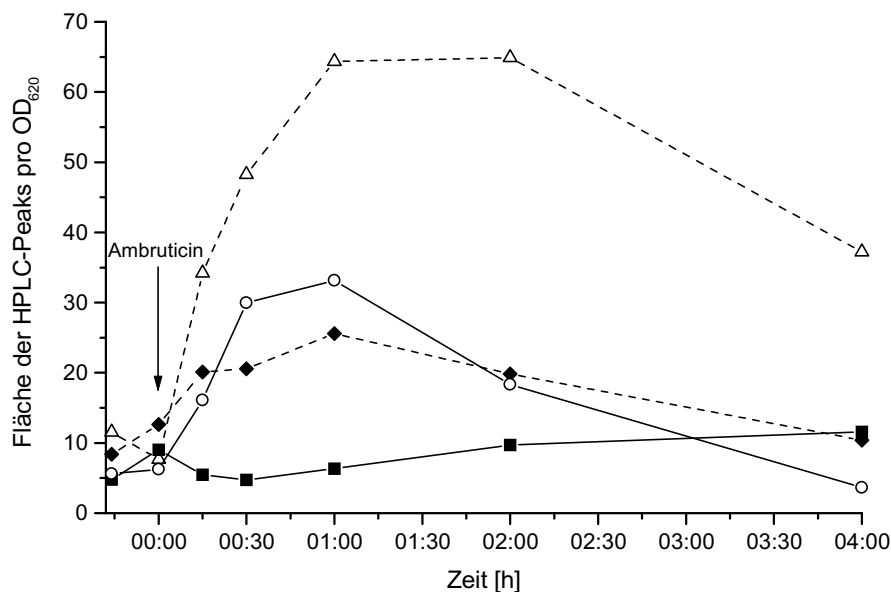


Abb. 55: Intrazelluläre  $^{14}\text{C}$ -Glycerinakkumulation aus  $\text{U-}^{14}\text{C}$ -Glucose bei *H. anomala* in Glucose-reduziertem Minimalmedium sowie in Glucose-freiem Casamino acid-Medium mit  $0,1 \mu\text{g/ml}$  Ambruticin ( $\circ/\triangle$ ) und in der Kontrolle ( $\blacksquare/\blacklozenge$ )

### 3.7.3.1 Glucoseaufnahme

Aus Glucose-freiem Casamino acid-Medium wurde auch mit  $0,1 \mu\text{g/ml}$  Ambruticin die markierte Glucose binnen 30 min vollständig aufgenommen, so daß darin kein Unterschied zur Kontrolle erkennbar war (Abb. 56). Ferner war bei den Ambruticin-behandelten Zellen ebenfalls (vgl. 3.6.12) ein Austritt an Radioaktivität zu erkennen, d.h., die Zellen waren permeabel geworden. Bei Glucose-haltigem Medium waren mit  $0,1 \mu\text{g/ml}$  Ambruticin binnen 30 min keine Unterschiede zur Kontrolle zu erkennen, danach wurde die Glucoseaufnahme reduziert und schließlich vollständig gestoppt während sie in der Kontrolle über 4 h ungestört weiterlief (Abb. 56).

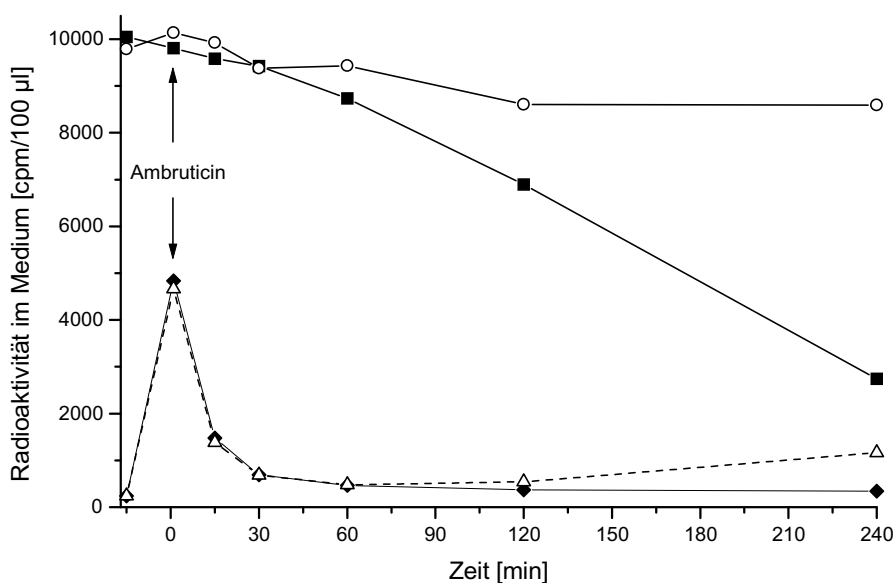


Abb. 56: Glucoseaufnahme aus Minimalmedium sowie aus Glucose-freiem Casamino acid-Medium mit 0,1 µg/ml Ambruticin (○/△) und in der Kontrolle (■/◆)

### 3.8 Lipidmuster

Weil die Zellen 45 min nach Zugabe von Ambruticin permeabel geworden sind (vgl. 3.6.12), wurde dessen Einfluß auf das Lipidmuster bei *H. anomala* untersucht.

#### 3.8.1 Lipidmuster von *H. anomala*

Abb. 57 zeigt die Veränderung des Lipidmusters von *H. anomala* nach Zugabe von 0,1 µg/ml Ambruticin im Vergleich zur Kontrolle. Daraus wird ersichtlich, daß 1 h nach Ambruticin-Zugabe die Zellen verstärkt Triacylglyceride ( $R_f$  0,83) akkumulierten und nach 2 h zusätzlich freie Fettsäuren auftraten ( $R_f$  0,45).

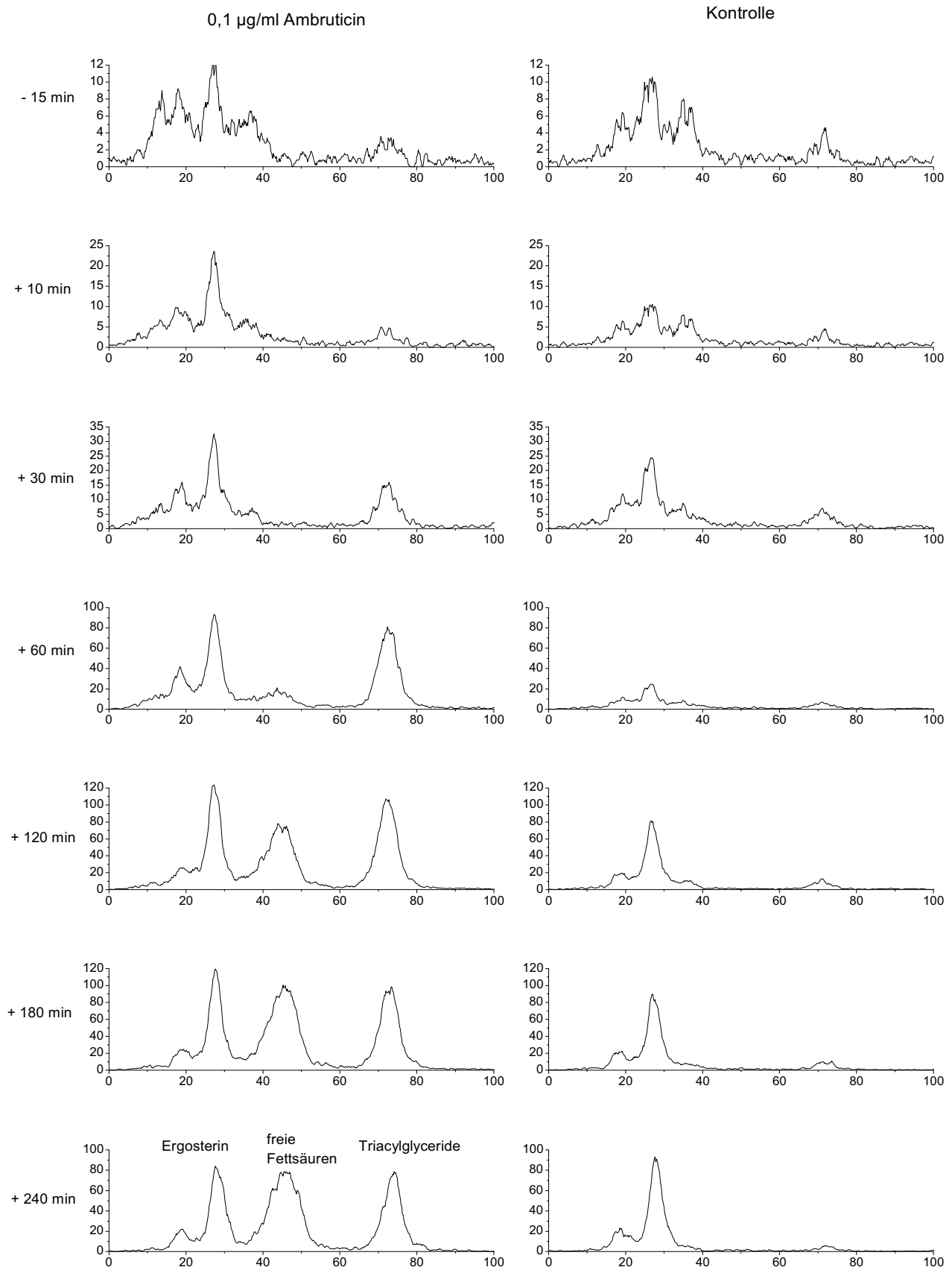


Abb. 57: Mittels DC aufgetrennte, mit  $^{14}\text{C}$ -Acetat-markierte Lipide von *H. anomala* nach Zugabe von 0,1 µg/ml Ambruticin (linke Reihe) im Vergleich zur Kontrolle (rechte Reihe). Ordinate: Radioaktivität [cpm], Abszisse: Laufstrecke auf der DC-Platte [mm]

Die Abb. 58 veranschaulicht den zeitlichen Verlauf der Veränderungen im Lipidmuster von *H. anomala* nach Zugabe von 0,1 µg/ml Ambruticin im Vergleich zu Kontrolle.

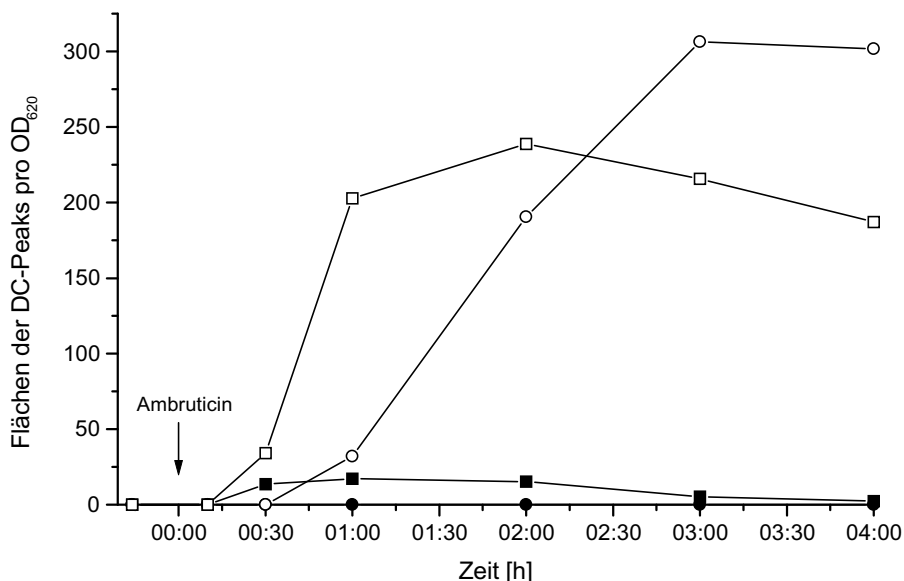


Abb. 58: Akkumulation von <sup>14</sup>C-Acetat-markierten Triacylglyceriden (□) und freien Fettsäuren (○) bei *H. anomala* nach Zugabe von 0,1 µg/ml Ambruticin im Vergleich zur Kontrolle (■ bzw. ●)

Abb. 59 zeigt, daß 4 h nach Zugabe von 0,1 µg/ml Pyrrolnitrin bei *H. anomala* ein ähnliches Lipidmuster wie nach Zugabe von 0,1 µg/ml Ambruticin erhalten wurde. Allerdings war die Akkumulation freier Fettsäuren mit Pyrrolnitrin weniger ausgeprägt als bei Ambruticin.

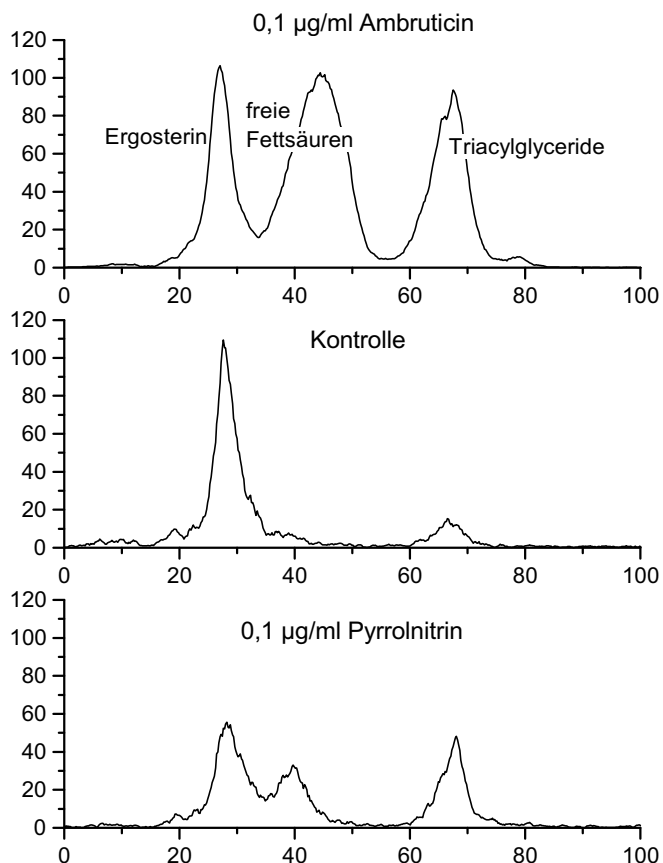


Abb. 59: Vergleich der Lipidmuster von *H. anomala* 4 h nach Zugabe von 0,1 µg/ml Ambruticin bzw. Pyrrolnitrin und Kontrolle. Ordinate: Radioaktivität [cpm], Abzisse: Laufstrecke auf der DC-Platte [mm]



### 3.8.2 Lipidmuster bei *H. anomala* R<sup>Amb</sup>

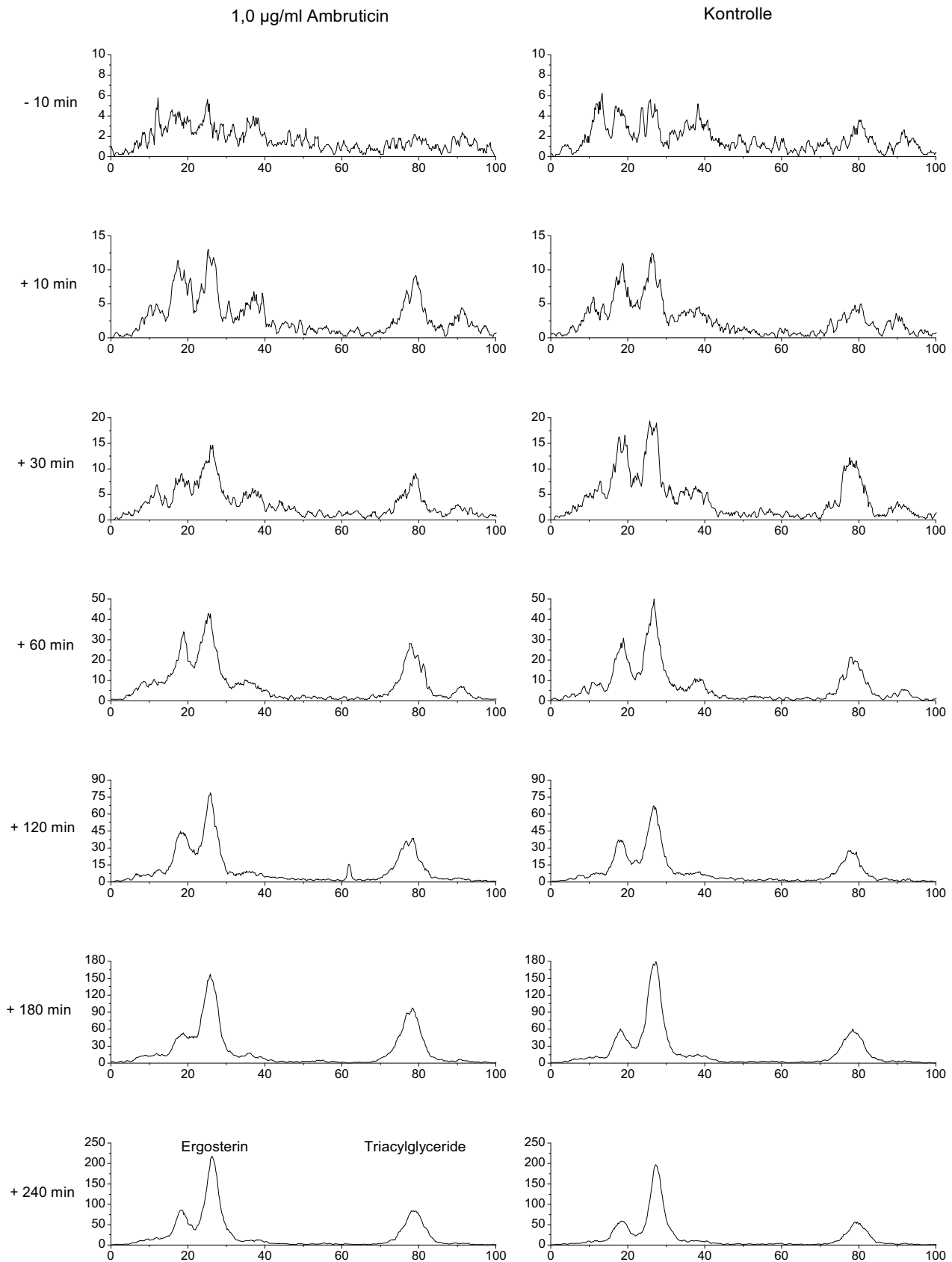


Abb. 60: Mittels DC aufgetrennte, mit  $^{14}\text{C}$ -Acetat-markierte Lipide von *H. anomala* R<sup>Amb</sup> nach Zugabe von 1,0 µg/ml Ambruticin (linke Reihe) im Vergleich zur Kontrolle (rechte Reihe). Ordinate: Radioaktivität [cpm], Abzisse: Laufstrecke auf der DC-Platte [mm]

Bei der Resistenzmutante zeigten sich nach Zugabe von 1,0 µg/ml Ambruticin keine Veränderungen im Lipidmuster im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 60), ebenso ist es sehr ähnlich dem Lipidmuster der sensitiven Zellen ohne Ambruticin-Behandlung (Abb. 57 - rechte Reihe). Im Unterschied zu diesen konnte bei *H. anomala* R<sup>Amb</sup> ein etwas höherer Gehalt an Triacylglyceriden nachgewiesen werden.

### 3.8.3 Charakterisierung des Lipidextraktes

Abb. 61 zeigt den mittels DC aufgetrennten Lipidextrakt (*H. anomala* nach 3-stündiger Behandlung mit 0,1 µg/ml Ambruticin) nach Acetylierung mit Trifluoracethanhydrid bzw. saurer Umesterung mit Salzsäure und Methanol. Der unbehandelte Lipidextrakt zeigt die erwarteten drei Peaks von Ergosterin, freien Fettsäuren und Triacylglyceriden. Nach Acetylierung blieben die Peaks der freien Fettsäure und Triacylglyceride erwartungsgemäß erhalten, während das Ergosterin infolge der Acetylierung verschwunden ist. Hingegen konnten mit Salzsäure und Methanol die freien Fettsäuren zu Fettsäuremethylestern verestert werden und ebenso die Fettsäuren der Triacylglyceride nach saurer Hydrolyse.

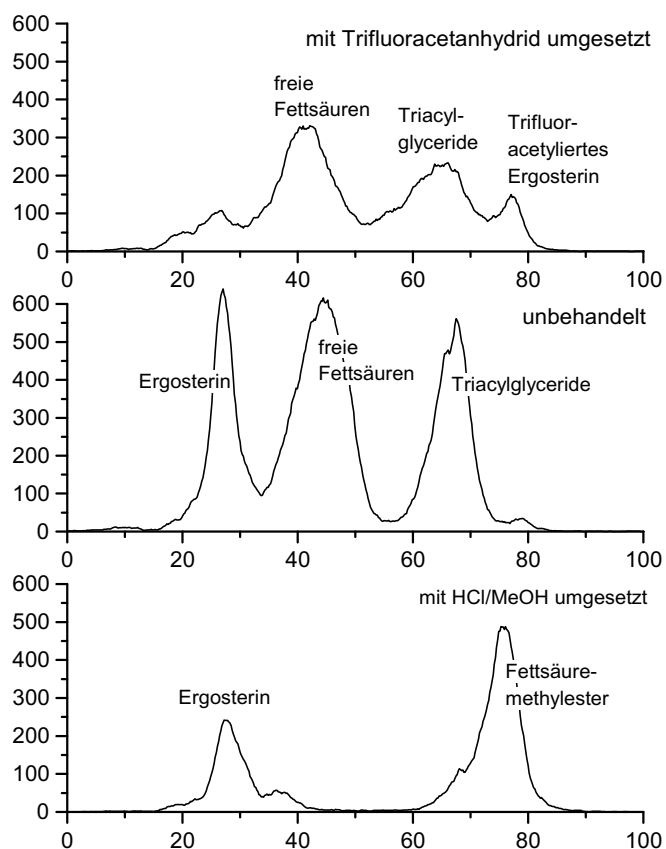


Abb. 61: <sup>14</sup>C-Acetat-markierter Lipidextrakt von *H. anomala* (3 h mit 0,1 µg/ml Ambruticin) acetyliert mit Trifluoracethanhydrid bzw. sauer umgeestert mit Methanol im Vergleich zum nicht umgesetzten Lipidextrakt. Ordinate: Radioaktivität [cpm], Abzisse: Laufstrecke auf der DC-Platte [mm]

Diese Reaktionen sind neben der Zuordnung über die R<sub>F</sub>-Werte ein weiterer deutlicher Hinweis, daß es sich bei den postulierten Lipidklassen wirklich um Ergosterin, freie Fettsäuren und Triacylglyceride handelte.

### 3.8.4 Charakterisierung der Lipide $R_f$ 0,45 und $R_f$ 0,83

Es sollte auch an den isolierten Lipiden gezeigt werden, daß es sich um freie Fettsäuren ( $R_f$  0,45) bzw. um Triacylglyceride ( $R_f$  0,83) handelte. Abb. 62 zeigt, daß die Triacylglyceride erwartungsgemäß sauer mit Methanol zum Fettsäuremethylester umgeestert bzw. alkalisch mit Ethanol teils zu Fettsäuren hydrolysiert und teils zu Fettsäureethylestern umgeestert werden konnten.

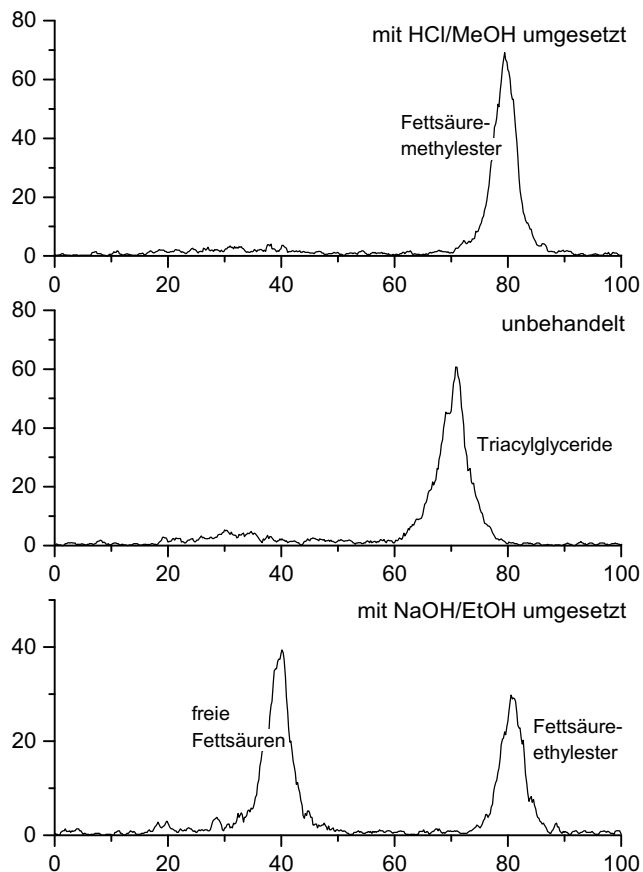


Abb. 62: Triacylglycerid-Peak ( $R_f$  0,83) von *H. anomala* (3 h mit 0,1 µg/ml Ambruticin) sauer bzw. alkalisch umgeestert im Vergleich zum nicht umgesetzten Triacylglycerid. Ordinate: Radioaktivität [cpm], Abzisse: Laufstrecke auf der DC-Platte [mm]

Ebenso konnten die freien Fettsäuren ( $R_f$  0,45) sauer mit Methanol zu Fettsäuremethylestern verestert werden (Abb. 63).

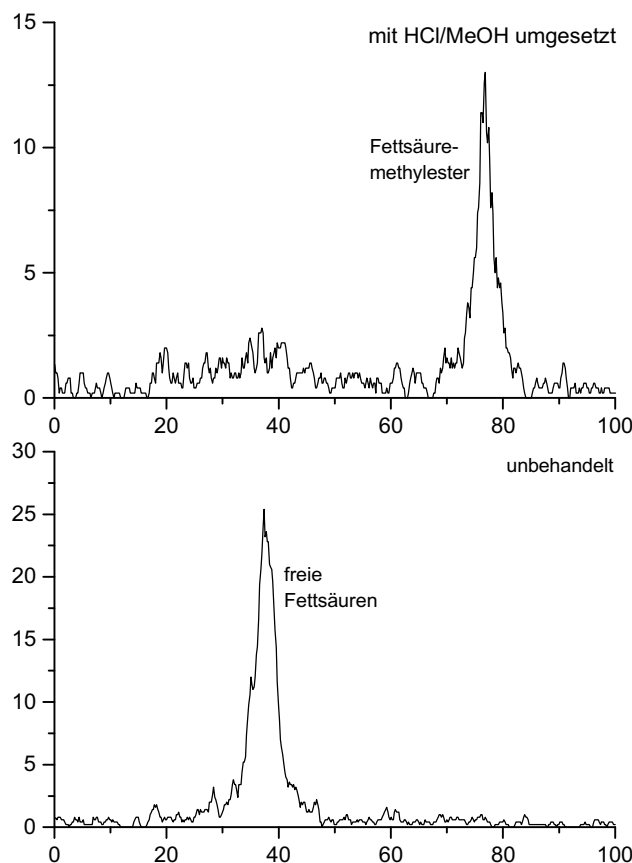


Abb. 63: Peak der freien Fettsäuren ( $R_f$  0,45) von *H. anomala* (3 h mit 0,1  $\mu\text{g/ml}$  Ambruticin) sauer verestert im Vergleich zu nicht umgesetzten Fettsäuren. Ordinate: Radioaktivität [cpm], Abzisse: Laufstrecke auf der DC-Platte [mm]

Somit konnte sowohl durch das Laufverhalten ( $R_f$ -Werte) sowie durch das chemische Verhalten bestätigt werden, daß es sich bei den beiden Lipiden um freie Fettsäuren bzw. Triacylglyceride handelte.

### 3.8.5 Steroidsynthese

Eine Akkumulation freier Fettsäuren in Zellen ist ungewöhnlich, weshalb auch über die Steroidsynthese nachgewiesen werden sollte, daß es sich bei dem Lipid  $R_f$  0,45 um kein Steroid handelte. Aus Abb. 64 geht hervor, daß mit Mevalonsäure als Präkursor der radioaktive Lipid-Peak  $R_f$  0,45 fehlt, d.h., bei diesem Lipid handelt es sich nicht um ein Steroid. Insgesamt war der Einbau nur sehr gering, aber es konnte trotzdem gezeigt werden, daß es sich bei dem Lipid  $R_f$  0,22 um ein Sterin handelte. Da dieser Lipid-Peak nach dem Besprühen mit Rhodamin B (vgl. 2.11) unter dem UV-Licht stets dunkel erschien und dieses nur bei Ergosterin (nicht bei Lanosterin oder Cholesterin) der Fall ist, wurde dieses Lipid als Ergosterin identifiziert.

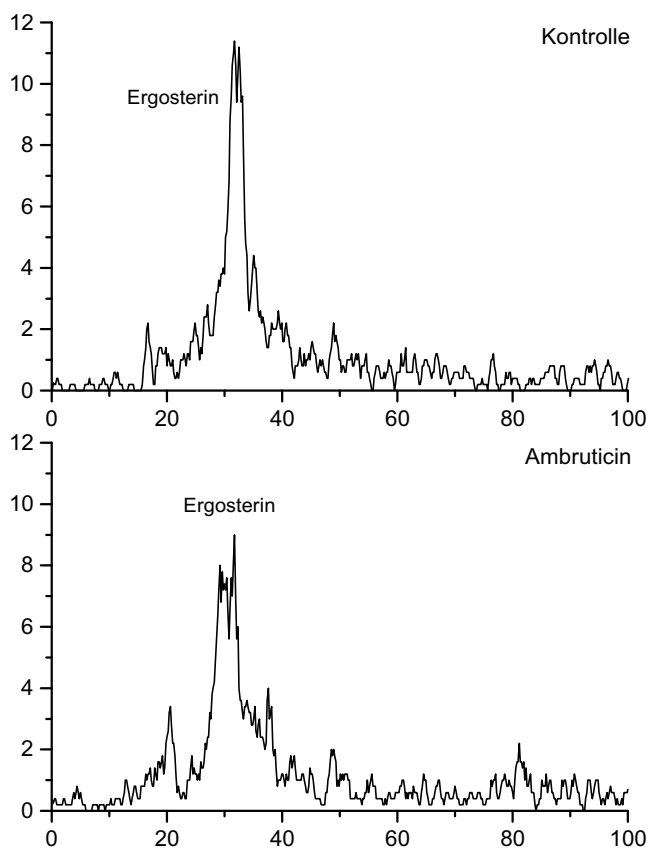


Abb. 64:  $^{14}\text{C}$ -Mevalonsäure-markierter Lipidextrakt von *H. anomala* (4 h mit 0,1 µg/ml Ambruticin) im Vergleich zur Kontrolle. Ordinate: Radioaktivität [cpm], Abzisse: Laufstrecke auf der DC-Platte [mm]

### 3.9 Untersuchungen zur Reversibilität des Ambruticineffektes

Hiermit sollte gezeigt werden, ob das Ambruticin fungistatisch oder fungizid wirkt. Bei einem fungistatischen Effekt könnte durch Entzug des Ambruticins dieser Effekt aufgehoben werden und die Zellen müßten weiter wachsen können. Wirkt Ambruticin hingegen fungizid, so wäre dieses nicht mehr möglich.

#### 3.9.1 Mediumwechsel

Bei Kulturen von *H. anomala* mit 1,0 µg/ml Ambruticin wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten ein Mediumwechsel durchgeführt. Abb. 65 zeigt, daß nach einem einfachen Mediumwechsel die Zellzahlen um 1 – 2 Größenordnungen abnahmen, d.h., das Ambruticin konnte nicht aus den Zellen entfernt werden. Auch nach 20 h konnten sich die Zellen nicht wieder regenerieren.

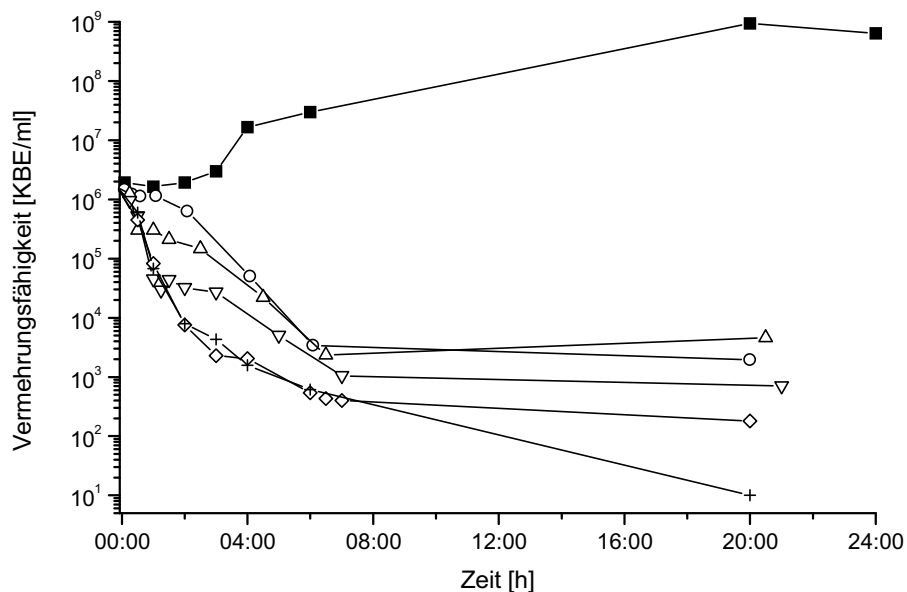


Abb. 65: Vermehrungsfähigkeit (als KBE/ml) von *H. anomala* nach einem Mediumwechsel 5 (○), 30 (△), 60 (▽) und 360 (◇) min nach Zugabe von 1,0 µg/ml Ambruticin. Kontrolle ohne Mediumwechsel (+) und Kontrolle ohne Ambruticin (■)

### 3.9.2 XAD-Zugabe

Aus einer Kultur von *H. anomala* mit 1,0 µg/ml Ambruticin wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Subkulturen gebildet, zu denen das Adsorberharz XAD-16 zugegeben wurde.

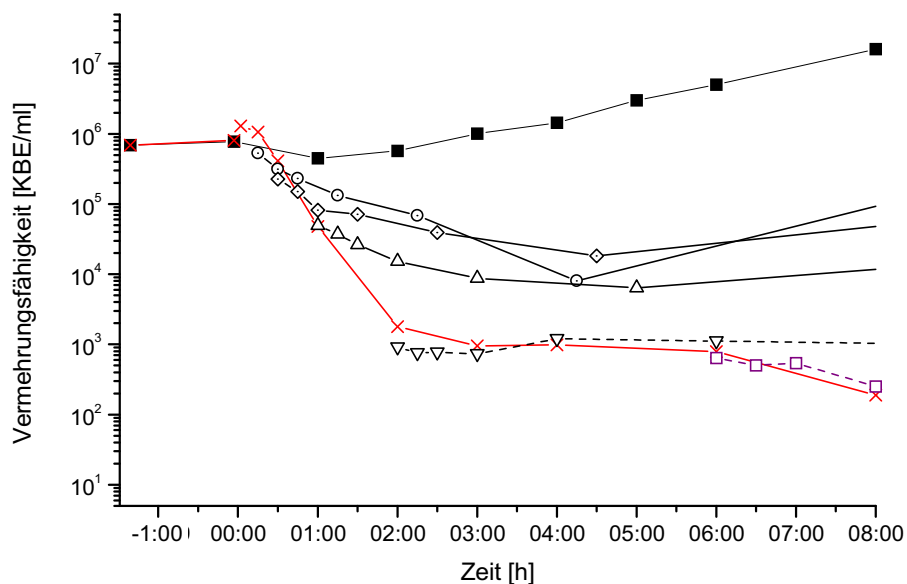


Abb. 66: Vermehrungsfähigkeit von *H. anomala* mit 1,0 µg/ml Ambruticin nach Zugabe von 10% XAD-16-Suspension (v/v) nach 15 (○), 30 (◇) min bzw. 1 (△), 2 (▽), 6 (□) h. Kontrolle ohne XAD-Zugabe (×) und Kontrolle ohne Ambruticin (■)

Ohne XAD-Zugabe waren binnen 2 h 99,9% der Zellen nicht mehr vermehrungsfähig. Die Zugabe von XAD-16 stoppte das Absterben der Zellen jedoch nicht schlagartig, sondern nur zeitverzögert: Auch nach XAD-Zugabe sank die KBE/ml zum Teil noch um den Faktor 10 und stabilisierte sich dann auf niedrigem Niveau (Abb. 66).

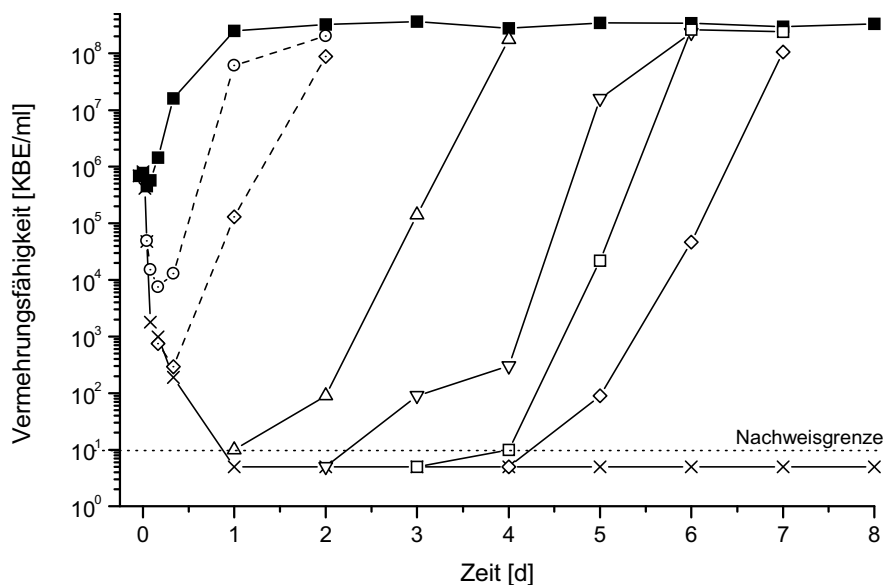


Abb. 67: Langzeitwirkung von XAD-16 auf die Vermehrungsfähigkeit von *H. anomala* mit 1,0 µg/ml Ambruticin: XAD-Zugabe nach 1 (○), 4 (◇) h bzw. 1 (Δ), 2 (▽), 3 (□), 4 (◊) Tagen. Kontrolle ohne XAD-Zugabe (x) und Kontrolle ohne Ambruticin (■)

Im Langzeitversuch zeigte sich aber, daß die Ambruticin-behandelten Zellen nach XAD-Zugabe wieder vermehrungsfähig wurden. Abb. 67 zeigt, daß die Zellen aus allen Ansätzen zu normalen Zelldichten heranwuchsen. Das XAD adsorbierte das freie Ambruticin, so daß die noch nicht abgestorbenen Zellen sich wieder vermehren konnten. Wurde das XAD erst fünf Tage nach dem Ambruticin zugegeben, konnten sich die Zellen nicht wieder regenerieren. Bei den regenerierten Zellen handelte es sich nicht um spontane Resistenzmutanten, da sich von  $2 \times 10^8$  KBE/ml lediglich  $0 - 5 \times 10^2$  Kolonien auf Ambruticin-haltigen Agarplatten bildeten.

### 3.9.3 XAD und Lipid-Extraktion

Auch für den XAD-Versuch mit <sup>14</sup>C-Acetat-markierten Lipiden wurde eine Absterbekurve aufgenommen, um zu zeigen, daß die KBE/ml nach der Ambruticin-Zugabe sank und durch XAD-Zugabe wieder regeneriert werden konnte (Abb. 68).

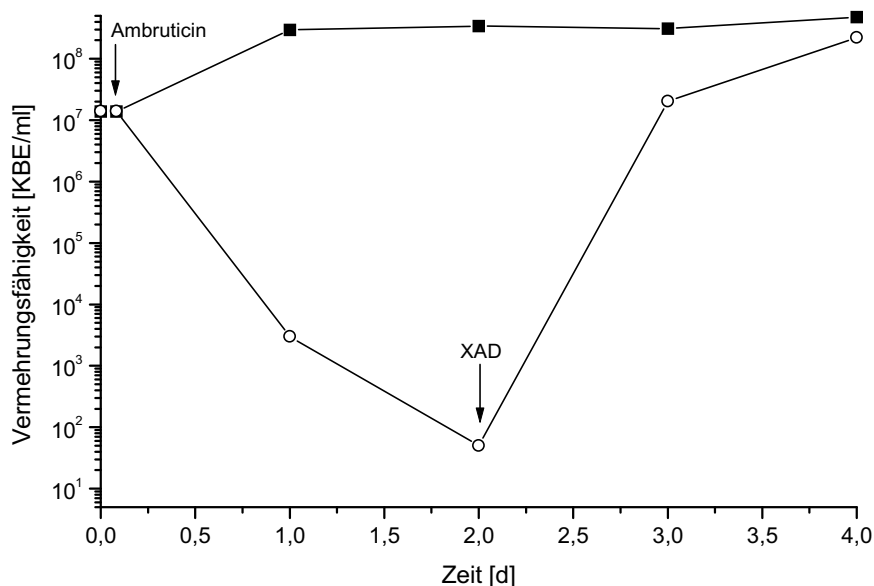


Abb. 68: Vermehrungsfähigkeit von *H. anomala* mit 0,5 µg/ml Ambruticin nach Zugabe von 10 % XAD-16-Suspension (v/v) im Versuch zur Extraktion <sup>14</sup>C-Acetat-markierter Lipide. Kontrolle ohne Ambruticin (■)

Durch das XAD-16 wurde den Zellen das zugegebene Ambruticin entzogen, so daß sich diese regenerieren konnten. Darüber hinaus adsorbierten auch die freien Fettsäuren am XAD (Abb. 69, ①). Das Lipidmuster der regenerierten Zellen entsprach (qualitativ) wieder dem der Kontrolle (Abb. 69, ③, ④). Erwartungsgemäß wurden im XAD-Extrakt der Kontrolle (fast) keine markierten Lipide gefunden (Abb. 69, ②); allerdings konnte aus den Zellen des Kontrollansatzes (quantitativ) etwa nur  $\frac{1}{10}$  der markierten Lipide wie aus den Zellen der Probe extrahiert werden.

Ferner konnte beobachtet werden, daß nach 4-tägigem Wachstum die Kontrollzellen deutlich mehr markierte Triacylglyceride gebildet hatten als nach 6-stündigem Wachstum; zu diesem Zeitpunkt war der Ergosterin-Peak schon sehr deutlich ausgebildet, während sich der Triacylglycerid-Peak nur andeutete (vgl. Abb. 57, Abb. 59).



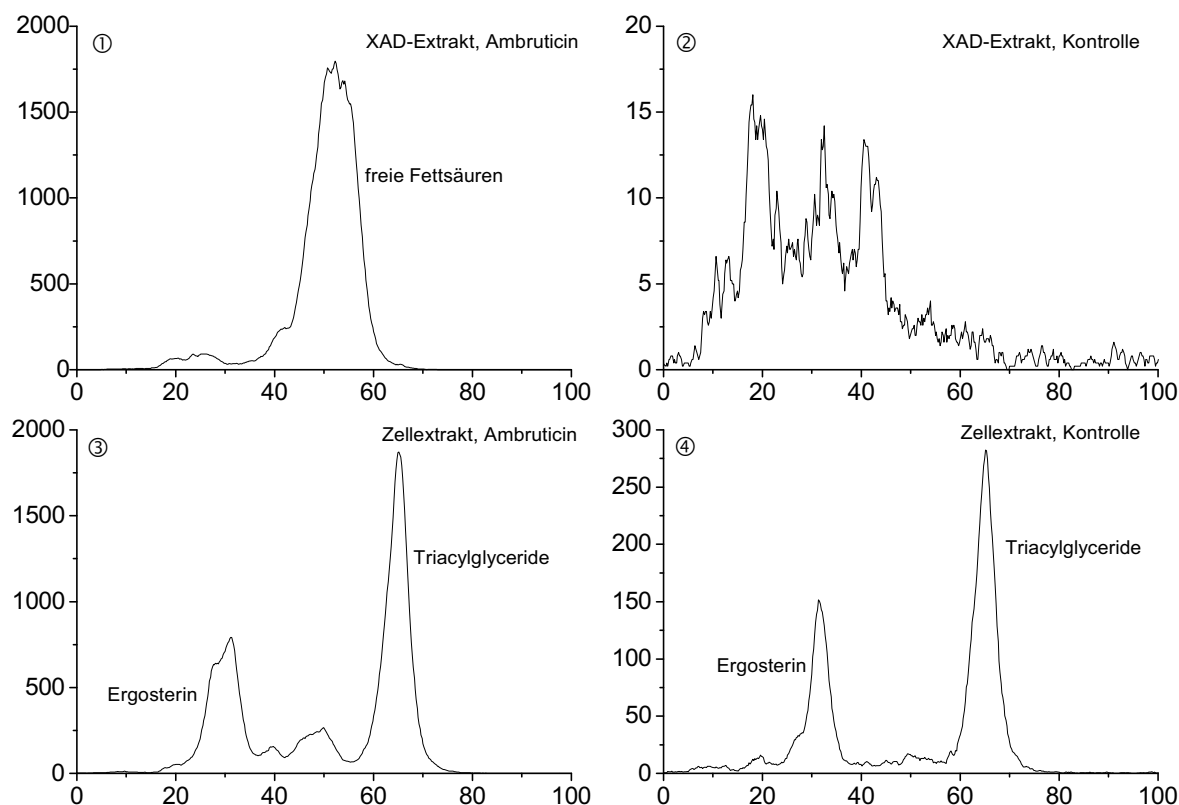
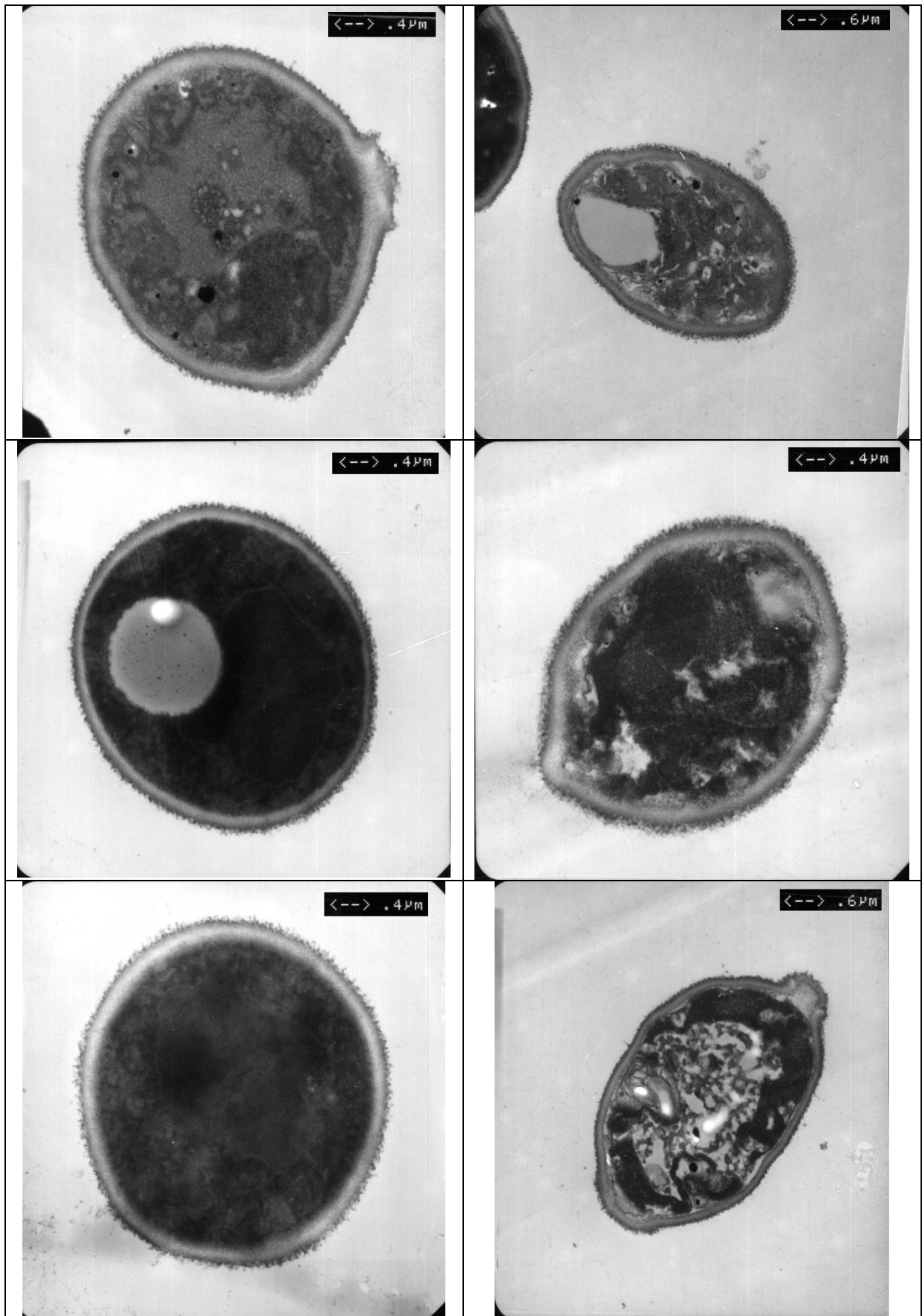


Abb. 69: Mittels DC aufgetrennter  $^{14}\text{C}$ -Acetat-markierter Lipidextrakt aus mit XAD-16 regenerierten Zellen (Zellextrakt), die vorher für zwei Tage mit  $0,5 \mu\text{g/ml}$  Ambruticin behandelt worden waren, sowie die am XAD adsorbierten Lipide (XAD-Extrakt). Die Kontrollzellen wurden nicht mit Ambruticin behandelt. Zu beachten sind die unterschiedlichen Skalen auf der Ordinate. Ordinate: Radioaktivität [cpm], Abzisse: Laufstrecke auf der DC-Platte [mm]

### 3.10 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die TEM-Aufnahmen ergaben, daß 4 h nach Zugabe von  $0,1 \mu\text{g/ml}$  Ambruticin die überwiegende Mehrzahl der Zellen von *H. anomala* gegenüber den Kontrollzellen deutlich verändert waren. Die Zellstrukturen sowie die Zellmembranen wirkten völlig aufgelöst (Abb. 70, rechte Reihe), während in der Kontrolle die Zellen klare abgegrenzte Zellstrukturen hatten (Abb. 70, linke Reihe). In den Proben 1 h nach Ambruticin-Zugabe waren nur bei einigen Zellen solche Schäden zu erkennen, so daß zu diesem Zeitpunkt die Schädigungen noch nicht signifikant zu sein schienen.

Abb. 70 (folgende Seite): TEM-Aufnahmen von *H. anomala*-Zellen, 1 min vor Ambruticin-Zugabe (linke Reihe). Zu erkennen sind klare, organisierte Zellstrukturen sowie Zellmembranen, welche die ganze Zelle durchziehen. Bei der Abbildung oben links ist eine Knospungsstelle, bei der Abbildung mitte links ist der Nukleus gut zu sehen. TEM-Aufnahmen von *H. anomala*-Zellen 4 h nach Ambruticin-Zugabe (rechte Reihe). Die Zellen wirken wie aufgelöst, es sind keine Zellstrukturen mehr zu erkennen



zu Abb. 70: *H. anomala* 1 min vor Ambruticin-Zugabe

*H. anomala* 4 h nach Ambruticin-Zugabe

## 4 Diskussion

Als geeigneter Testorganismus erwies sich die Hefe *Hansenula anomala*, weil sie sehr leicht auch in definiertem Minimalmedium zu kultivieren war und mit einer MHK von  $0,05 \mu\text{g/ml}$   $\approx 0,1 \mu\text{M}$  sehr sensitiv gegenüber Ambruticin war. Außerdem ist *H. anomala* nicht pathogen, was die Arbeiten vereinfachte. Schlüter konnte eine spontane Resistenzmutante, *H. anomala* R<sup>Amb</sup>, isolieren [62], was Ringel mit den Pilzen *Microsporum fulvum* und *Histoplasma capsulatum* nicht gelang [58]. Mit der „Standardhefe“ *Saccharomyes cerevisiae* konnte leider nicht gearbeitet werden, da diese resistent gegen Ambruticin war (vgl. 3.1).

### 4.1 Voruntersuchungen

Da sich die Kultivierungsbedingungen bei den Versuchen oftmals leicht unterschieden, wurde untersucht, ob dieses einen Einfluß auf die MHK hatte. Die Vorinkubation konnte für *H. anomala* zwischen 0 und 6 h variieren, ohne daß sich die MHK veränderte (vgl. Abb. 12). Simpkin hingegen stellte fest, daß *Candida parapsilosis* empfindlicher war, wenn das Ambruticin S in der lag-Phase (0 – 4 h Vorinkubation), als wenn es in der log-Phase (8 h Vorinkubation) zugegeben worden war; im letzteren Fall wuchsen die Zellen sogar bei 10facher MHK wieder zur normalen Zelldichte heran [64].

Ringel et al. [60] und Simpkin [64] fanden, daß Ambruticin S bei niedrigen pH-Werten toxischer wirkte als bei hohen. Dieses könnte dadurch erklärt werden, daß Ambruticin S unter sauren Bedingungen ungeladen vorliegt und dann leichter von den Zellen aufgenommen werden kann. Für das amphotere Ambruticin VS-3 konnte für den pH-Bereich 5,0–8,0 kein Einfluß auf die MHK beobachtet werden (vgl. 3.1.2); dieses bestätigt auch die Ergebnisse von Gerth [20].

Bei einem erhöhten Inokulum von  $10^7$  Zellen/ml gegenüber dem Standardinokulum von  $10^6$  Zellen/ml, erhöhte sich die MHK leicht von  $0,05 \mu\text{g/ml}$  auf  $0,075 \mu\text{g/ml}$  (vgl. Abb. 11). Auch Ringel konnte zeigen, daß mit einer Vergrößerung des Inokulums die MHK stieg [58]. Ambruticin reduzierte bei Konzentrationen größer MHK die Vermehrungsfähigkeit der Hefezellen innerhalb von 2 – 6 h um 99,9% (vgl. Abb. 13). Ringel konnte für die Sporen von *Microsporum fulvum* ebenfalls einen fungiziden Effekt feststellen, jedoch senkte es die Vermehrungsfähigkeit erst nach 24–48 h deutlich [58]. Im sub-MHK-Bereich wirkte Ambruticin fungistatisch und bestätigt damit Ringels Beobachtungen [58]. Auf stoffwechselinaktive Zellen, die in der Kälte oder in Puffer gehalten wurden, wirkte Ambruticin nicht (vgl. Abb. 13, Abb. 49). Dieses deckt sich mit dem Ergebnis von Ringel, daß auskeimende Sporen empfindlicher reagierten als ausgewachsene Mycelzellen [58] und widerspricht der Beobachtung Simpkins, daß Zellen in der log-Phase weniger empfindlich seien. Gerth et al. konnten auch für Jerangolid A zeigen, daß dieses nicht auf stoffwechselinaktive Zellen wirkt [21].

Durch einen einfachen Mediumwechsel konnte der Ambruticin-Effekt nicht aufgehoben werden: Auch nach 20 h konnten sich die Zellen nicht wieder regenerieren (vgl. 3.9.1). Das bedeutet, daß Ambruticin nicht einfach aus den Zellen ausgewaschen werden konnte. Wurde hingegen zur Kultur das Adsorberharz XAD-16 gegeben, verringerte sich nicht nur die Vermehrungsfähigkeit der Zellen nicht weiter, sondern die Kultur wuchs wieder zur normalen Zelldichte heran (vgl. 3.9.2). Dabei handelte es sich vermutlich um Zellen, die während der Ambruticin-Zugabe stoffwechselinaktiv waren und deshalb nicht geschädigt wurden. Nachdem das Ambruticin durch das XAD-16 dem Medium entzogen worden war, konnten diese Zellen binnen 1–2 Tage wieder anwachsen. Die Regeneration erfolgte mit der üblichen Vermehrungsrate, so daß es unwahrscheinlich ist, es könne sich um eine Regeneration geschädigter oder im Wachstum gestoppter Zellen handeln. Es waren auch keine Resistenzmutanten, da die Zellen nicht auf Ambruticin-haltigen Agarplatten wuchsen. Das bedeutet, daß Ambruticin schnell und irreversibel fungizid wirkt.

Gerth et al. konnten für die Resistenzmutante *H. anomala* R<sup>Amb</sup> zeigen, daß eine Kreuzresistenz zu den Jerangoliden wie auch zu Pyrrolnitrin bestand [21]. Dieses konnte nicht nur bestätigt werden, sondern es zeigte sich darüber hinaus, daß Ambruticin sowohl mit Jerangolid A (vgl. Abb. 26) als auch mit Pyrrolnitrin (vgl. Abb. 25) synergistisch wirkte. Die synergistische Wirkung der Antibiotika deutet auf einen gleichen Wirkmechanismus hin, eventuell an demselben Zielmolekül. Leider war der Wirkmechanismus von Pyrrolnitrin ebenfalls lange Zeit im unklaren. Mit weiteren 25 Fungiziden, deren Wirkmechanismen bekannt sind, konnten keine weitere Kreuzresistenzen gefunden werden (vgl. Tab. 24).

## 4.2 Katabolismus

Die CO<sub>2</sub>-Produktion aus Glucose wurde erst nach über 2 h inhibiert (vgl. Abb. 46), d. h., der Katabolismus kam erst sehr spät zum Erliegen; dieses hat auch Schlüter beobachtet [62]. Bei einer Inhibierung des Katabolismus würde erwartet werden, daß sich die CO<sub>2</sub>-Produktion erhöht, weil das ATP nur über die weniger effektive Substratkettenphosphorylierung gebildet werden könnte. In diesem Fall müßte auch eine stärkere Glucoseaufnahme und eine erhöhte Ethanolproduktion zu erkennen sein, was aber nicht der Fall war (vgl. Abb. 52, Abb. 56).

Die Energieladung des Adenylat-Systems, also der Energiezustand der Zelle, erhöhte sich rasch von 0,4 auf 0,55 (vgl. Abb. 27). Dieses deutet ebenfalls darauf hin, daß der Katabolismus nicht der primäre Angriffspunkt von Ambruticin ist, weil den Zellen dann weniger Energie zur Verfügung stehen müßte. Allerdings ist die Energieladung in der Kontrolle mit 0,4 sehr niedrig, üblicherweise werden bei aerob auf Glucose wachsenden Hefen (*S. cerevisiae*) Werte von 0,8 gemessen [5]. Die durch Folgefehler weniger beeinflusste Bestimmung des ATP-Gehaltes zeigte ebenfalls einen Anstieg des ATP-Gehaltes nach

Ambruticin-Zugabe (vgl. Abb. 27), wenn auch langsamer, so daß der Trend richtig zu sein scheint.

Die Biosynthesen liefen nicht gleichzeitig wegen Energiemangels aus, sondern in einem Zeitraum von 0,5–2 h (vgl. 3.6.13), was ein weiterer Hinweis ist, daß der Katabolismus nicht der primäre Angriffspunkt von Ambruticin ist. Außerdem haben Antibiotika, welche die Atmungskette inhibieren, meist kein so eingeschränktes Wirkungsspektrum wie Ambruticin und wirken nicht nur gegen (einige) Pilze, sondern auch oft und hauptsächlich gegen Säugerzellen (vgl. 1.2.3.4). Ambruticin ist für Säugerzellen aber nur wenig toxisch.

### 4.3 Anabolismus

Als erstes wurde durch Zugabe verschiedenster Metabolite nach Antagonisten von Ambruticin gesucht. Dabei galt es zu erkennen, ob durch Ambruticin ein metabolischer Block gesetzt wird, der durch Zugabe nachfolgender Metabolite wieder aufgehoben werden kann. Beim Wachstum auf unterschiedlichen C- oder N-Quellen sollte geklärt werden, ob die Wirkung des Ambruticins durch Ermöglichung anderer Stoffwechselwege vermindert oder aufgehoben werden kann. Weil die Biosynthesen stets allmähliche binnen 0,5 – 2 h nach Ambruticin-Zugabe ausliefen (vgl. 3.6.13), sollte geklärt werden, ob der Vitaminstoffwechsel gehemmt wird. Eine Hemmung der Vitaminsynthese dürfte sich erst nach einiger Zeit bemerkbar machen, da die Vitamine als Cofaktoren in enzymatischen Reaktionen, im Gegensatz zum Substrat, nicht verbraucht werden und die Zellen deshalb eine gewisse Zeit ohne Vitamin-Neusynthese mit ihrem Vitaminpool überleben können. Es konnte aber nur ein leichter antagonistischer Effekt durch Zugabe von kleinen organischen Säuren aus dem Citrat-Zyklus beobachtet werden (vgl. Tab. 17), was auch die Ergebnisse von Simpkin [64] und Schlüter [62] bestätigt. Andere Metabolite, wie Aminosäuren, Zucker (vgl. Tab. 18), Nucleinsäuren, Lipide sowie Vitamine (vgl. Tab. 19) zeigten keinen antagonistischen Effekt. Wuchsen die Zellen auf unterschiedlichen C-Quellen (Zucker, Aminosäuren; vgl. Tab. 18) oder N-Quellen (vgl. Tab. 20), hatte dieses ebenfalls keinen Einfluß auf die MHK. Bestimmte Metabolite könnten nicht antagonistisch gewirkt haben, weil sie von den Zellen nicht aufgenommen worden sind. Dieses ist aber sicher für die Metabolite auszuschließen, mit denen *H. anomla* als einzige C-Quelle wachsen konnte.

Eine Vielzahl von Biosynthesen wurden untersucht, indem markierte Monomere verfüttert wurden und die Kinetik der Polymerisation durch Fällung des Polymers gemessen wurde. Alle wichtigen Biosynthesen, wie DNA (vgl. 2.9.1), RNA (vgl. 3.6.3), Proteine (vgl. 3.6.4), Lipide (vgl. 3.6.5, 3.6.7), Ergosterin (vgl. Abb. 57, 3.8.5), Zellwand (vgl. 3.6.10, Abb. 45), Polymere aus Pyruvat (vgl. 3.6.8) wie auch die Zellteilung (vgl. 3.6.10) liefen nur langsam zwischen 0,5–2 h aus. Deshalb konnte auch eine Inhibierung der Substrataufnahme nicht der Wirkmechanismus von Ambruticin sein.

Die Stoffwechselaktivität, gemessen als Dehydrogenase-Aktivität, blieb bei 0,1 µg/ml Ambruticin mit etwa 6 h sehr lange erhalten, während sie mit 1,0 µg/ml Ambruticin nach 90 min abbrach (vgl. 3.1.9). Auch dieses weist darauf hin, daß die Syntheseleistungen der Zellen nicht schnell inhibiert wurden.

#### 4.4 Resistenz

Da Ambruticin keinen Effekt auf die klassischen Wirkorte von Antibiotika zeigte, mußten neue Möglichkeiten untersucht werden. Dafür sollte geklärt werden, ob das Ambruticin überhaupt in die Zellen gelangte oder mit äußeren Rezeptoren wechselwirkte.

Ringel hatte beschrieben, daß durch Zugabe von Human-Serum die MHK für *M. fulvum* deutlich erhöht werden konnte [58]. Dieses bestätigte sich auch für *H. anomala* mit Kaninchen-Serum (vgl. Abb. 20). Der Anstieg der MHK entsprach der Menge des zugegebenen Serums, was bedeutet, daß das Ambruticin an einen Faktor bindet und somit den sensitiven Hefezellen nicht zur Verfügung stand. Dieser Faktor konnte durch Säure oder Erhitzen zerstört werden (vgl. Abb. 22) und hatte ein Molgewicht von größer 100.000 [Da] (vgl. Abb. 21). Dieses legt die Vermutung nahe, daß es sich bei dem Faktor um ein Protein handelt. Durch Zugabe von Zellextrakt der Resistenzmutante *H. anomala* R<sup>Amb</sup> zur Kultur der sensitiven Zellen konnte kein antagonistischer Effekt erzielt werden (vgl. Abb. 19).

Die resistenten Zellen entzogen dem Medium das zugegebene Ambruticin nicht, also weder bauten stoffwechselaktive Zellen das Ambruticin ab (Detoxifizierung), noch adsorbierte es an der Zellwand stoffwechselinaktiver Zellen (vgl. 3.1.5.1).

Da kein <sup>14</sup>C-markiertes Ambruticin hergestellt werden konnte (vgl. 3.5.6), wurde auf indirektem Wege versucht zu klären, ob Ambruticin in die Hefezellen gelangt. Dafür wurden die Zellen permeabilisiert bzw. Protoplasten hergestellt, damit die Zellen erleichtert lipophile Substanzen aufnehmen konnten. Dieses hatte jedoch keinen Einfluß auf die MHK, weder wurden die sensitiven Zellen noch empfindlicher, noch die resistenten Zellen sensitiv (vgl. 3.1.8 und 3.1.6). Mit Hilfe von Liposomen sollte Ambruticin in L929 Mauszellen transportiert werden, allerdings konnte nicht genau gemessen werden wieviel Ambruticin tatsächlich in den Liposomen eingeschlossen worden war. Die resistenten Mauszellen wurden aber nach Zugabe Ambruticin-haltiger Liposomen nicht sensitiv (vgl. 3.1.7). Es gelang aber mit den Liposomen, wenn auch nicht sehr gut, das nicht membrangängige Propidiumjodid in Protoplasten zu transportieren. Diese Versuche weisen darauf hin, daß der Resistenzmechanismus wohl keine Aufnahmeresistenz ist. Aber auch mit <sup>14</sup>C-Ambruticin wäre es schwierig zu unterscheiden, ob das Ambruticin in oder an den Zellen wirkt, da es fest am Zielmolekül binden müßte, um überschüssiges <sup>14</sup>C-Ambruticin abwaschen zu können.

## 4.5 Weitere Untersuchungen

Da weder die Hauptprozesse des Anabolismus noch des Katabolismus durch Ambruticin frühzeitig beeinträchtigt wurden, wurde nach weiteren, selteneren Wirkmechanismen gesucht. Dazu gehören unter anderem ein Einfluß auf Signalkaskaden und Regulationsmechanismen, auf die DNA als Informationsmatrix (Kernmembran, Topoisomerase, Strangbrüche) oder auf den Zellzyklus und das Cytoskelett (Tubulin, Aktin).

Es konnte gezeigt werden, daß Ambruticin nicht in die DNA interkalierte (vgl. 3.4.1) und auch keine DNA-Strangbrüche verursachte (vgl. 3.4.2).

## 4.6 Glycerin

Pillonel und Meyer veröffentlichten im Sommer 1998 [51], daß *Neurospora crassa* nach Zugabe von Phenylpyrrolen, wozu auch Pyrrolnitrin gehört, intrazellulär Glycerin akkumulierten. Sie führten dieses auf die Inhibierung einer regulatorischen Proteinkinase (PK-III) zurück, welche die Osmoregulationskaskade beeinflusst. Wegen der Kreuzresistenz und des Synergismus zwischen Ambruticin und Pyrrolnitrin wurde auch bei *H. anomala* eine Glycerinakkumulation untersucht.

Es konnte bestätigt werden, daß *H. anomala* bereits 15 min nach Zugabe von 0,1 µg/ml Ambruticin den intrazellulären Glyceringehalt verdreifacht hat und nach 30 min ein Maximum mit einem 4fach höheren Glyceringehalt aufwies (vgl. 3.7.1, 3.7.2). Dieser Effekt konnte auch durch Zugabe von 0,1 µg/ml Pyrrolnitrin erzielt werden (vgl. 3.7.1, 3.7.2). Das Glycerin wurde mit verschiedenen Methoden nachgewiesen, nämlich refraktonetrisch nach HPLC-Trennung sowie enzymatisch (vgl. 2.10.1, 2.10.2). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß mit U-<sup>14</sup>C-Glucose kultivierte Zellen bereits 15 min nach Zugabe von 0,1 µg/ml Ambruticin im Vergleich zur Kontrolle einen stark erhöhten intrazellulären Gehalt von markiertem Glycerin hatten (vgl. 3.7.3). Diese Ergebnisse stehen nicht im Widerspruch zur geringen Polymersynthese aus externem Glycerin (vgl. 3.6.6), da die Zellen nach Ambruticin-Zugabe sehr viel Glycerin synthetisierten und deshalb kein externes Glycerin aufnahmen.

Der spätere Verlust an intrazellulärem Glycerin nach 3 h (vgl. Abb. 51, Abb. 53, Abb. 55) ist vermutlich auf die anschließend erhöhte Permeabilität der Zellen zurückzuführen, so daß kleine Metabolite austreten konnten (vgl. 3.6.12).

### 4.6.1 Regulation der Glycerinsynthese bei Hefen

Die Akkumulation von Glycerin ist bei Hefen, so auch bei *H. anomala*, eine verbreitete Reaktion auf einen hypertonen osmotischen Schock [11; 15; 48]. Wird *S. cerevisiae* einem hypertonen osmotischen Schock ausgesetzt, findet zuerst eine Dehydratation statt und das Zellwachstum stoppt binnen 1 min. Die erste, schnelle Reaktion darauf ist ein Wasser-Influx

aus der Vakuole ins Cytosol [46; 67]. Die anschließende Adaptionsphase dauert, je nach Ausmaß des Schocks, 1 h bis mehrere Tage, in der die Physiologie der Zellen umgestellt wird. Anschließend wachsen die Zellen mit erhöhter Generationszeit weiter. In der Adaptionsphase sinkt die spezifische CO<sub>2</sub>-Bildung um etwa 20%, die Proteinbiosynthese, nachdem sie zuerst fast vollständig zum Erliegen kam, fällt um etwa 70% [9]. Der kurzfristige Einbruch der Proteinbiosynthese ist vermutlich auf die Dehydratation der Zellen nach dem Osmoseschock zurückzuführen; dieses konnte nach Ambruticin-Zugabe hingegen nicht beobachtet werden (vgl. 3.6.4).

Üblicherweise reduziert die cytosole, NAD-abhängige Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (GPD1) Dihydroxyacetonphosphat zu Glycerin-3-phosphat, welches anschließend von der Glycerin-3-phosphat-Phosphatase (GPP2) zu Glycerin dephosphoryliert wird. Die entsprechenden Gene (*GPD1* und *GPP2*) werden über Osmosensoren (HOG-Weg) reguliert.

Der Abbau von Glycerin erfolgt unter Phosphorylierung mit ATP durch die Glycerinkinase (*GUT1*), das gebildete Glycerin-3-phosphat wird von einer mitochondrialen, FAD-abhängigen Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase (mtGPD; *GUT2*) zu Dihydroxyacetonphosphat oxidiert und in die Glycolyse eingeschleust [1; 33; 48]. Das nach einem Osmoseschock akkumulierte Glycerin wird, wenn die Zellen wieder unter streßfreien Bedingungen leben, überwiegend ausgeschleust und kaum metabolisiert [3].

Eine Glycerinakkumulation kann auf verschiedene Arten erreicht werden:

- 1) Erhöhung der Glycerinsynthese: Die osmosensensitive *S. cerevisiae* erreicht dieses durch eine verstärkte de-novo Synthese der GPD1 während osmotolerante *Debaryomyces hansenii* die Enzymaktivität der konstitutiven GPD1 erhöht [11].
- 2) Verringerung der Glycerindissimilation, indem die Glycerinkinase-Aktivität gesenkt wird [48].
- 3) Erhöhung des Glycerinrückhaltes: Bei *S. cerevisiae* verursacht das Fps1-Protein Membrankanäle [48], die eine erleichterte Diffusion und somit einen erhöhten Austritt von Glycerin zur Folge haben [8; 26]. Bei osmotoleranten Hefen wie *H. anomala*, *D. hansenii* oder *Zygosaccharomyces rouxii* kommt es zu Lipidveränderungen, welche die Membran weniger permeabel für Polyole macht [3; 8; 11; 15; 26].
- 4) Aufnahme von externem Glycerin wurde z.B. für *Z. rouxii* beschrieben, nicht aber für *S. cerevisiae* [26; 48].

Die Regulation der Glycerinsynthese nach einem Osmoseschock ist über eine Proteinkinasekaskade, dem sog. HOG-Weg (High Osmolarity Glycerol Response), reguliert und wurde bisher vor allem für *S. cerevisiae* untersucht. Der Osmosensor Sln1p/Ypd1p aktiviert über die Proteinkinasen Ssk1p, Ssk2p/Ssk22p, Pbs2p schließlich Hog1p, welches die Expression der GPD1 erhöht. Der Osmosensor Sho1p wirkt über Ste11p und Pbs2p ebenfalls auf Hog1p [10; 57]. Bereits 1 min nach dem Osmoseschock ist Hog1p maximal phosphoryliert und führt nun zu einer erhöhten Expression von GPD1, GPP2 (zur Bildung von Glycerin) aber auch von GCY1 (Glycerin-Dehydrogenase) und DAK1 (Dihydroxyaceton-Kinase) womit zur Feinregu-



lation Glycerin wieder zu Dihydroxyacetonphosphat metabolisiert wird [2; 49]. Darüber hinaus werden auch Enzyme wie HXT1 (Hexose-Transporter) und GLK1 (Glucose-Kinase) zur Einschleusung von Glucose in die Glycolyse verstärkt expremiert, während Enzyme wie TDH3 (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), ENO2 (Enolase), PDC1 (Pyruvat-Decarboxylase), ADH1 (Alkohol-Dehydrogenase), ALD6 (Aldehyd-Dehydrogenase) vermindert gebildet werden, damit der Abfluß aus der Glycolyse vermindert wird. Scheinbar widersprüchlich dazu wird vermehrt ALD5 (oxidiert Acetaldehyd zu Acetat und stellt damit NADH zu Glycerinproduktion zur Verfügung), ENO1, TDH1 und weniger HXK2 (Hexokinase) gebildet, was vermutlich auf komplexe Regulationsmechanismen zurückzuführen ist [10; 48; 49]. Neben den Enzymen zur direkten Osmoseantwort werden über den HOG-Weg auch andere Enzyme reguliert. So werden über STRE (Stress-responsive element) allgemeine Streßenzyme wie CTT1 (Katalase T), DDR2 (DNA damage repair) sowie eine Reihe von Hitzeschockproteinen (HSPx) vermehrt gebildet [9]. Unklar ist jedoch bisher, wie Hog1p agiert, da noch kein Zielmolekül gefunden werden konnte [2].

Der Ras-Adenylat-Cyclase-Sensor reagiert bei guter Nährstoffsituation im Medium so, daß der second messenger cAMP aus ATP gebildet wird. Damit kann der Repressor Bcy1p vom katalytischen Zentrum Tpk der Proteinkinase A (PKA) abgespalten werden, so daß Tpk die Zellproliferation startet. Die Proteinkinase Yak1p ist ein Gegenspieler von Tpk, sie unterdrückt die Zellproliferation und fördert die Streßtoleranz. Die PKA wirkt antagonistisch zum HOG-Weg, indem sie die von Hog1p aktivierten Kinasen Msn2p/Msn4p, welche die STRE-induzierte Transkription fördern, inhibiert [67]. Dieses zeigt, daß es verschiedene Rückkopplungen zwischen Zellproliferation und Streßresistenz gibt. Auch für Ambruticin konnte gezeigt werden, daß stoffwechselinaktive sensitive Zellen resistent geworden waren (vgl. Abb. 13, 3.6.12), allerdings blieb unklar, ob dieses auf eine erhöhte Streßtoleranz (z.B. geringe PKA-Aktivität) zurückzuführen ist, oder ob einfach auf Grund mangelnder Energie die Zellen nicht mehr die Ambruticin-induzierten Stoffwechselveränderungen und Schädigungen durchführen konnten.

Bei hypotonisch osmotischem Streß wird über den Sensor Stt4p und über die Proteinkinase C (PKC1) die Proteinkinasekaskade (Bck1p, Mkk1p/Mkk2p, Mpk1p) aktiviert, so daß FPS1, ein Membranprotein, das für eine erleichterte Diffusion des Glycerins sorgt, gebildet wird [67]. Der PKC-Weg ist ebenfalls involviert bei Reaktionen auf Hitze und Nährstoffmangel sowie bei der Zellwandsynthese, weshalb Defektmutanten (*BCK1*, *MKK1*, *MKK2* oder *MPK2*) bei Temperaturen über 37 °C permeabel werden können [14; 67]. In Kombination mit Defektmutationen in *PPZ1* oder *PPZ2* (kodieren Proteinphosphatasen) werden die Zellen bei jeder Temperatur permeabel [67].

Die Komplexheit der Regulationsmechanismen zeigt sich unter anderem auch darin, daß Mutanten, die GPD1 überexpremieren, nicht verstärkt Glycerin bilden. Außerdem konnte Blomberg zeigen, daß etwa 150 Proteine mittels 2D-PAGE erfaßt werden konnten, deren Syntheserate sich nach einem Osmoseschock um den Faktor zwei geändert hatte, und dabei

werden mit dieser Methode nur etwa 25% der zellulären Enzyme erfaßt [9]. Die Abb. 71 veranschaulicht die komplexen Regulationsmechanismen.

Nach einem Osmoseschock (bis 8% NaCl) dauert die intrazelluläre Glycerinakkumulation bei den salztoleranten Hefen *D. hansenii* mit 2 – 4 h etwa eine Generationszeit [3] und bei *Z. rouxii* etwa 1 h [71], während die Glycerinproduktion nach der Ambruticin-Zugabe wesentlich schneller erfolgte (vgl. 3.7). *H. anomala* bildet als Antwort auf einen Osmoseschock ebenfalls Glycerin, das sein Maximum zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase erreicht. Danach sinkt der intrazelluläre Glyceringehalt und die Zellen bilden statt dessen Arabit als compatibles Solut [15]. Eine Ambruticin-induzierte Arabit-synthese konnte nicht nachgewiesen werden; allerdings erreichten die mit Ambruticin behandelten Zellen auch nicht mehr die exponentielle oder gar stationäre Phase. *S. cerevisiae* bildet hingegen nur Glycerin und kein Arabit als compatibles Solut [8].

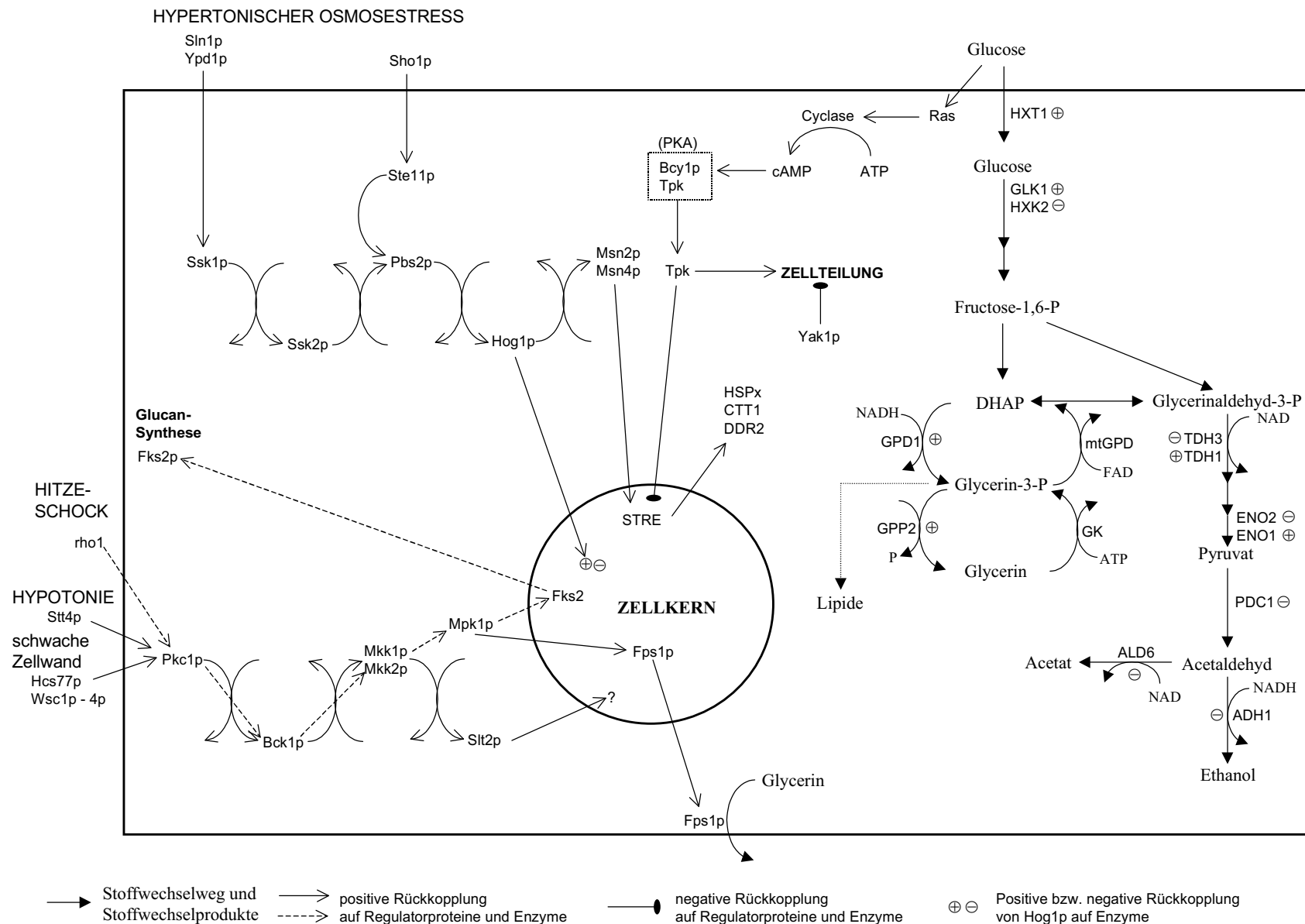


Abb. 71: HOG-Weg (High Osmolarity Glycerol Response) für *S. cerevisiae* [nach 10; 37; 57; 67]. Erläuterungen siehe Text

## 4.7 Veränderungen im Lipidmuster

Da die sensitiven Zellen 45 – 60 min nach Ambruticin-Zugabe permeabel wurden (vgl. 3.6.12), wurde auch der Einfluß von Ambruticin auf das Lipidmuster untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß die Ergosterinsynthese nicht beeinflußt wurde (vgl. 3.8.5). Dafür begannen die Zellen bereits nach 30 min Triacylglyceride und nach 60 min freie Fettsäuren zu akkumulieren (vgl. Abb. 58). In der Kontrolle mit der Resistenzmutante konnten diese Veränderungen nicht nachgewiesen werden (vgl. Abb. 60); dementsprechend wurden die resistenten Zellen auch bei 10,0 µg/ml Ambruticin nicht permeabel. Die freien Fettsäuren akkumulierten erst deutlich nach dem Glycerin, was bedeutet, daß das Glycerin nicht durch Lipaseaktivität aus Triacylglyceriden freigesetzt worden war. Außerdem wurde keine Abnahme von Triacylglyceriden festgestellt (vgl. Abb. 58). Der  $^{14}\text{C}$ -Acetat-Einbau in die TCA-fällbare Fraktion war im Vergleich zur Kontrolle nicht erhöht, was bei einer verstärkten Fettsäure-Neusynthese erwartet worden wäre. Aber die Lipidsynthese brach nach Zugabe von 0,1 µg/ml Ambruticin erst nach 2 h ab (vgl. Abb. 39), was im Vergleich zu vielen anderen Synthesen sehr spät war. Ebenso blieb die Stoffwechselaktivität nach Zugabe von 0,1 µg/ml Ambruticin lange erhalten (vgl. Abb. 24), was ein weiterer Hinweis auf die Synthese der freien Fettsäuren ist. Die Freisetzung der Fettsäuren aus Phospholipiden durch Phospholipasen ist weniger wahrscheinlich, weil kein gleichzeitiger Anstieg phosphorylierter Zucker aus  $^{14}\text{C}$ -Glucose nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 54).

Wurde zu den Ambruticin-behandelten Zellen das Adsorberharz XAD-16 gegeben, konnten noch nicht abgetötete Zellen regeneriert werden. Wurden in diesem Ansatz die Lipide mit  $^{14}\text{C}$ -Acetat markiert, so entsprach das Lipidmuster der regenerierten Zellen dem der Kontrolle. Nur in dem XAD-Extrakt der Ambruticin-behandelten Probe konnten markierte Fettsäuren nachgewiesen werden. Dieses könnte darauf hindeuten, daß die freien Fettsäuren, die üblicherweise kaum in Membranen auftreten [53], die Membranintegrität so gestört haben, daß die Zellen schließlich permeabel wurden.

Die Störung der Membranintegrität durch Ambruticin ist dabei nicht auf physikalische Schädigungen zurückzuführen, da stoffwechselinaktive Zellen durch Ambruticin nicht permeabel wurden (vgl. 3.6.12). Im Gegensatz dazu steht Amphotericin B, welches physikalisch durch Wechselwirkung mit den Sterinen die Membranintegrität zerstört [43].

Eine Veränderung der Membranzusammensetzung als Folge eines osmotischen Schocks ist bei osmotoleranten Hefen nicht ungewöhnlich [66] und bewirkt bei *H. anomala*, im Gegensatz zu *S. cerevisiae*, einen 15fach besseren Glycerinrückhalt [8]. Für *Z. rouxii* wurden die Membranveränderungen genauer untersucht [68]: In der lag-Phase konnte ein starker Anstieg der Triacylglyceride und ein geringer Anstieg der freien Fettsäuren nachgewiesen werden, während die Phospholipide, Sterine und Sterinester in ihrer Zusammensetzung konstant blieben. Veränderungen solcher Art konnten auch Ambruticin-induziert bei *H. anomala* nachgewiesen werden. In der anschließenden exponentiellen Wachstumsphase

veränderte sich die Lipidzusammensetzung bei *Z. rouxii* erneut. Dieses Mal sank der Gehalt an Triacylglyceriden und freien Fettsäuren, während jener der Sterinester und Phospholipide anstieg. Zu diesen Veränderungen kam es Ambruticin-induziert bei *H. anomala* nicht; allerdings gelangten die Ambruticin-behandelten Zellen auch nicht mehr in die exponentielle Wachstumsphase.

Der letale Effekt des Ambruticins ist wahrscheinlich nicht auf die erhöhte Glycerinsynthese zurückzuführen, sondern auf die Veränderungen im Lipidmuster, so daß die Zellen permeabel wurden. Daß sich die Zellstruktur nach 4 h mit 0,1 µg/ml Ambruticin völlig aufgelöst hatte, zeigten auch die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen (vgl. Abb. 70).

Die Änderungen im Lipidmuster könnten durch die Osmoseregulationsmechanismen direkt induziert worden sein oder eine Folge der Glycerinakkumulation und den daraus resultierenden Verschiebung von Reaktionsgleichgewichten sein.

## 4.8 Ausblick

Das Zielenzym von Ambruticin zu isolieren und charakterisieren konnte nicht erreicht werden, es gäbe aber folgende Möglichkeiten, dies mit dem jetzigen Kenntnisstand zu erreichen.

### 4.8.1 Arbeiten mit $^{14}\text{C}$ -Ambruticin

Mit  $^{14}\text{C}$ -markiertem Ambruticin kann geklärt werden, ob Ambruticin von den sensitiven Zellen zu einer aktiven Form bzw. von den resistenten Zellen zu einer inaktiven Form metabolisiert wird, z. B. indem es nach Zugabe mit dem Adsorberharz XAD-16 aus der Kultur wieder extrahiert und anschließend der Extrakt dünnenschichtchromatographisch aufgetrennt wird.

Ebenso ist es möglich zu ermitteln, ob das Ambruticin in die Zellen aufgenommen wird oder ob es von außen z. B. auf einen Osmosensor wirkt. Im letzteren Fall dürfte keine Radioaktivität in den Zellen nachzuweisen sein. Voraussetzung für diese Arbeiten ist aber, daß das Ambruticin fest am Zielmolekül bindet, damit es auch nach den Waschvorgängen noch nachzuweisen ist.

### 4.8.2 Chromatographische Anreicherung

Pillonel und Meyer [51] reicherten eine Proteinkinase aus Zellextrakt von *Neurospora crassa* (105.000-g-Zentrifugat) nach Dialyse mittels DEAE-Chromatographie an. Die Proteinkinaseaktivität wurde als Phosphorylierung von Histon Typ II-A mit  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP bestimmt [34]. Entsprechendes könnte mit Zellextrakt von *H. anomala* durchgeführt werden.

### **4.8.3 Affinitätschromatographie**

Ambruticin kann an ein Gel gekoppelt werden, um das Zielenzym daran zu binden und so abzutrennen. Geeignet wäre z.B. das Affi-Gel 102 (Fa. Biorad), an dessen freie Aminogruppe mit Hilfe des Kopplungsreagenz EDAC (1-Ethyl-3-[3-diethylaminopropyl]carbodiimid) Ambruticin mit seiner Carboxylatgruppe gebunden wird. Auch bei dieser Methode müßte einerseits das Zielmolekül fest genug an Ambruticin binden, um es abtrennen zu können, und andererseits dürfte es nicht so fest binden, damit man es anschließend wieder eluieren kann. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung kann die Reinheit des Eluats überprüft werden.

### **4.8.4 Gelelektrophorese**

Zellextrakt kann per SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Nach dem Lauf werden die Proteine mit Guanidin $\times$ HCl denaturiert und durch Auswaschen desselben wieder renaturiert. Der Proteinkinasetest wird mit  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP durchgeführt, als Substrat wird Histon oder Myelinbindendes-Protein (MBP) copolymerisiert. Die Gelelektrophorese kann ein- oder zwei-dimensional durchgeführt werden und müßte unterschiedliche Phosphorylierungsmuster für sensitive und resistente Zellen mit Ambruticin, Pyrrolnitrin oder nach einem Osmoseschock im Vergleich zu den Kontrollen ergeben. Wird das Ambruticin nach der Auftrennung zugegeben, kann getestet werden, ob die Proteinkinase auch in vitro moduliert wird [31; 38]. Nach einer Auftrennung könnte durch Zugabe von <sup>14</sup>C-Ambruticin als Sonde das Zielenzym auf dem Gel lokalisiert werden.

Bei einer eindimensionalen Elektrophorese kann nur wenig Protein aufgetrennt werden, so daß wegen der Vielzahl der Proteinkinasen eine Wiederfindung bzw. Identifizierung schwierig sein kann.

### **4.8.5 Charakterisierung und Sequenzierung**

Kann das Zielenzym chromatographisch oder elektrophoretisch isoliert werden, so kann dieses klassisch charakterisiert werden, indem das Molgewicht bestimmt und eine Kinetik der Enzymhemmung durch Ambruticin aufgenommen wird.

Darüber hinaus kann das isolierte Enzym sequenziert werden, so daß mit der Aminosäuresequenz ein Datenbank-Vergleich möglich wird. Damit könnten Aussagen über homologe Enzyme in anderen Organismen getroffen werden, die z.B. auch eine Wirkortresistenz erklären würden.

### **4.8.6 Genetik**

Das Resistenzgen kann identifiziert werden, indem von der Resistenzmutante genomische DNA-Fragmente, z.B. mit 2-Mikron-Plasmiden, in den sensitiven Stamm übertragen werden.

Die Selektion der so resistent gewordenen Zellen kann auf Ambruticin-haltigen Agarplatten erfolgen. Allerdings kann nur bei einer Wirkortresistenz damit auch das Zielmolekül identifiziert werden. Bei dem Resistenzgen kann es sich auch um einen offenen Leserahmen handeln, womit zwar das Gen und somit die Aminosäuresequenz des Enzyms bekannt ist, nicht aber seine Funktion. So wurde z.B. bei der Identifizierung des *AURI*-Gens, das die Aureobasidin A-Resistenz bei *S. cerevisiae* kodiert, ein offener Leserahmen gefunden [25].

Defektmutanten im HOG-Weg können unter streßfreien Bedingungen normal wachsen, während sie nach einem Osmosestreß nicht adäquat reagieren, d.h. nicht schnell Glycerin akkumulieren. Würde nun eine solche (definierte) Mutante nach Ambruticin-Zugabe ebenfalls kein Glycerin akkumulieren, wäre dieses ein Hinweis auf das Zielmolekül. Eine Mutante, deren Defekt früher in der HOG-Signalkaskade liegt, müßte dann weiterhin Ambruticin-sensitiv sein, eine Mutante deren Defekt später in der HOG-Signalkaskade liegt, müßte Ambruticin-resistent sein. Problematisch bliebe jedoch, daß solche Mutanten nur für *S. cerevisiae* beschrieben sind, die per se Ambruticin-resistent sind, und nicht für die sensitive *H. anomala*.

## 5 Zusammenfassung

- 1) Ambruticin hemmte eine Vielzahl von Biosynthesen erst spät. Stoffwechsellinaktive Zellen waren nicht sensitiv. Darüberhinaus wirkte es sehr spezifisch, so ist z.B. *Candida parapsilosis* sensitiv, *C. albicans* hingegen resistent.
- 2) Ambruticin wirkte bereits bei geringen Konzentrationen zwischen 20–400 nM gegen eine Vielzahl von Hefen und Pilzen letal. Die Zahl der vermehrungsfähigen Zellen von *Hansenula anomala* wurde mit der MHK binnen 4–6 h um 99,9% gesenkt.
- 3) Ambruticin wirkte synergistisch mit den chemisch verwandten Jerangoliden, aber auch mit Pyrrolnitrin, das eine ganz andere Struktur hat.
- 4) Auf den Katabolismus wirkte Ambruticin nicht, d.h., die energieliefernden Prozesse blieben über einen langen Zeitraum erhalten, wie die WST-1 Färbung oder die CO<sub>2</sub>-Freisetzung aus <sup>14</sup>C-Glucose zeigten.
- 5) Die gängigen Biosynthesen, wie DNA-, RNA-, Protein-, Lipid- oder Zellwandsynthese wurden durch Ambruticin nicht inhibiert. Der Einbau der jeweiligen <sup>14</sup>C-Präkursoren kam erst spät zum Erliegen.
- 6) Ambruticin zeigte keine direkten Wechselwirkungen mit der DNA, wie die Absorptionsspektren zeigten, und verursacht keine DNA-Strangbrüche, was aus der gelelektrophoretischen Auftrennung der chromosomalen DNA hervorging.
- 7) Eine direkte Membranschädigung verursachte Ambruticin nicht, da stoffwechsellinaktive Zellen, die <sup>14</sup>C-Isoaminobutyrat akkumuliert hatten, nicht permeabel wurden.
- 8) Ambruticin verursachte eine rasche intrazelluläre Glycerinakkumulation, was vermutlich auf einen Eingriff auf das Osmoregulationssystem zurückzuführen ist. Glycerin konnte enzymatisch sowie refraktometrisch nach HPLC-Trennung nachgewiesen und auch mit <sup>14</sup>C-Glucose radioaktiv markiert werden.
- 9) Das akkumulierte Glycerin wurde nicht aus Lipiden freigesetzt, da kein gleichzeitiger Anstieg der freien Fettsäuren nachgewiesen werden konnte.
- 10) Nach der Glycerinakkumulation veränderten die Zellen ihre Lipidzusammensetzung, sie begannen Triacylglyceride und später auch freie Fettsäuren zu akkumulieren. Daraufhin wurden die Zellen permeabel, wie die Freisetzung akkumulierter <sup>14</sup>C-Isoaminobuttersäure zeigte, und die gesamte Zellorganisation wurde zerstört, was durch die TEM-Aufnahmen gezeigt wurde.



- 11) Als Resistenzmechanismus ist eine Aufnahmeresistenz wenig wahrscheinlich, da das Ambruticin lipophil und somit vermutlich membrangängig ist. Ferner blieben permeabilisierte Zellen oder Protoplasten von *H. anomala* R<sup>Amb</sup> resistent. Die resistenten Zellen detoxifizierten Ambruticin nicht, der Überstand blieb für sensitive Zellen weiterhin toxisch.
- 12) Abb. 72 veranschaulicht den zeitlichen Verlauf der durch 0,1 µg/ml Ambruticin induzierten Veränderungen bei *H. anomala*: Die KBE/ml nahmen binnen 4 h um etwa drei Größenordnungen ab, während die Stoffwechselaktivität (WST-1) über diesen Zeitraum erhalten blieb. Der erste schnelle Effekt war eine starke Glycerinakkumulation, die ihr Maximum bereits nach 30 min erreicht hatte. Dem folgte der Anstieg des Triacylglyceridgehaltes, der nach 30 min begann und nach etwa 1 h sein Maximum erreichte. Die Anreicherung von freien Fettsäuren begann erst nach 45–60 min. Gleichzeitig begannen die Zellen permeabel zu werden (Isoaminobutyrat). Die völlige Desorganisation der zellulären Strukturen führte schließlich zum Zelltod.

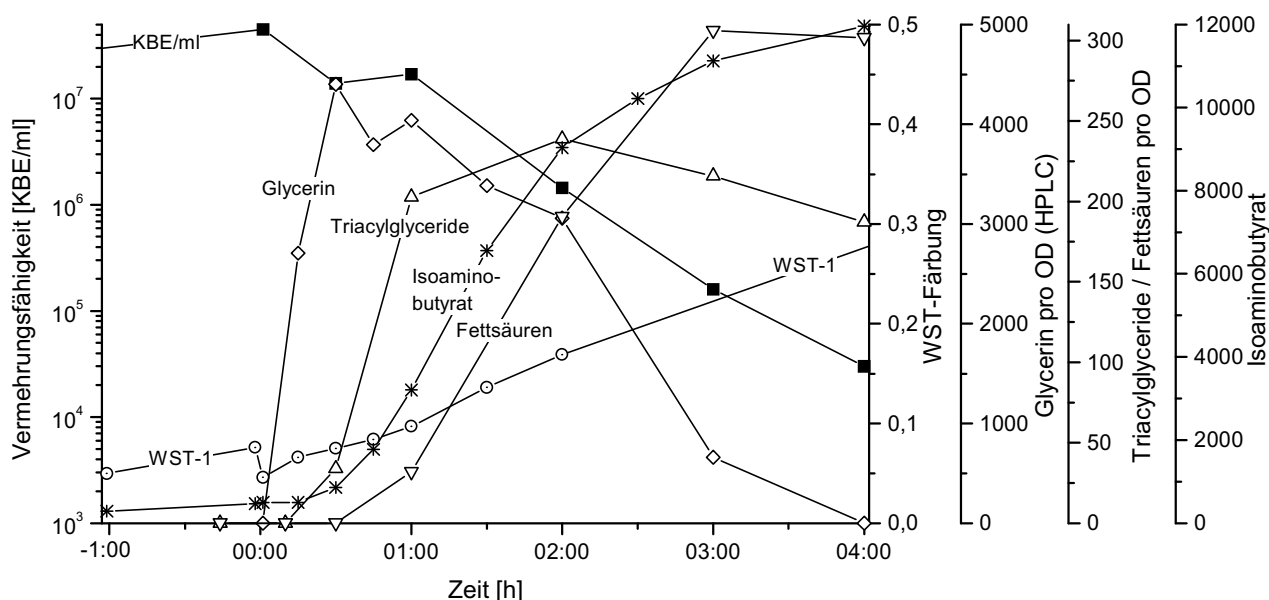


Abb. 72: Darstellung der zeitlichen Abfolge der einzelnen Effekte, die 0,1 µg/ml Ambruticin bei sensiblen Zellen von *H. anomala* bewirkt

- 13) Von Pillonel und Meyer wurde für Pyrrolnitrin postuliert, daß eine Proteinkinase in der Osmoseregulationskaskade inhibiert wird [51]. Das ist auch für Ambruticin sehr wahrscheinlich, da zum einen neben Kreuzresistenz und Synergismus auch die weiteren Folgen ähnlich wie bei einem Osmoseschock zu erkennen waren, nämlich die Akkumulation von Glycerin und die Änderung der Lipidzusammensetzung.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] Adler, L., A. Blomberg & A. Nilsson (1985) Glycerol metabolism and osmoregulation in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. J. Bacteriol. **162**: 300-306
- [2] Akhtar, N., A. Blomberg & L. Adler (1997) Osmoregulation and protein expression in a *pbs2Δ* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* during adaption to hypersaline stress. FEBS Lett. **403**: 173-180
- [3] André, L., A. Nilsson & L. Adler (1988) The role of glycerol in osmotolerance of the yeast *Debaryomyces hansenii*. J. Gen. Microbiol. **134**: 669-677
- [4] Aris, J.P. & G. Blobel (1991) Isolation of yeast nuclei. In Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology (Hrsg. Guthrie, C. & G.R. Fink), Serie Methods in Enzymology (Hrsg. Abelson, J.N. & M.I. Simon) Academic Press, New York: 735-749
- [5] Ball, W.J. & D.E. Atkinson (1975) Adenylate energy charge in *Saccharomyces cerevisiae* during starvation. J. Bacteriol. **121**: 975-982
- [6] Barnett, J.A., R.W. Payne & D. Yarrow (1990) Yeast Characteristics and Identification. Cambridge University Press, Cambridge
- [7] Barrett-Bee, K. & N. Ryder (1992) Biochemical aspects of ergosterol biosynthesis inhibition. In Emerging Targets in Antibacterial and Antifungal Chemotherapy (Hrsg. Sutcliffe, J.A. & N.H. Georgopapadakou) Chapman and Hall, New York: 410-436
- [8] Bellinger, Y. & F. Larher (1987) A <sup>13</sup>C comparative nuclear magnetic resonance study of organic solute production and excretion by the yeasts *Hansenula anomala* and *Saccharomyces cerevisiae* in saline media. Can. J. Microbiol. **34**: 605-612
- [9] Blomberg, A. (1995) Global changes in protein synthesis during adaption of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to 0.7 M NaCl. J. Bacteriol. **177**: 3563-3572
- [10] Blomberg, A. (1997) Osmoresponsive proteins and functional assessment strategies in *Saccharomyces cerevisiae*. Electrophoresis **18**: 1429-1440
- [11] Blomberg, A. & L. Adler (1993) Tolerance of fungi to NaCl. In Stress Tolerance of Fungi (Hg. Jennings, D.H.), Serie Mycology Series (Hg. Lemke, P.A.) Marcel Dekker, New York: 209-232
- [12] Brock, T.D., M.T. Madigan, J.M. Martinko & J. Parker (1994) Biology of Microorganisms. Prentice-Hall International, London

- [13] Connor, D.T., R.C. Greenough & M.v. Strandtmann (1977) W-7783, a unique antifungal antibiotic. *J. Org. Chem.* **42**: 3664-3669
- [14] Davenport, K.R., M. Sohaskey, Y. Kamada, D.E. Levin & M.C. Gustin (1995) A second osmosensing signal transduction pathway in yeast. *J. Biol. Chem.* **270**: 30157-30161
- [15] Eck, J.H.v., B.A. Prior & E.V. Brandt (1989) Accumulation of polyhydroxy alcohols by *Hansenula anomala* in response to water stress. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 3505-3513
- [16] Edlich, W. & H. Lyr (1992) Target sites of fungicides with primary effects on lipid peroxidation. *In* Target Sites of Fungicide Action (Hg. Köller, W.D.) CRC Press, Boca Raton: 53-68
- [17] Evans, C.T. & D. Conrad (1987) An improved method for protoplast formation and its application in the fusion of *Rhodotorula ruba* with *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **148**: 77-82
- [18] Falbe, J. & M. Regitz (1995) CD Römpp Chemie Lexikon. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- [19] Georgopapadakou, N.H. (1992) Chitin synthase as a chemotherapeutic target. *In* Emerging Targets in Antibacterial and Antifungal Chemotherapy (Hrsg. Sutcliffe, J.A. & N.H. Georgopapadakou) Chapman and Hall, New York: 476-494
- [20] Gerth, K. (1999) GBF Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Abt. Naturstoffbiologie (pers. Mitteilung)
- [21] Gerth, K., P. Washausen, G. Höfle, H. Irschik & H. Reichenbach (1996) The jerangolids: A family of new antifungal compounds from *Sorangium cellulosum* (Myxobacterium). Production, physico-chemical and biological properties of jerangolid A. *J. Antibiot.* **49**: 71-75
- [22] Gonzales, C. & J.M. Siverio (1992) Effect of nitrogen source on the level of nitrate reductase in the yeast *Hansenula anomala*. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 1445-1451
- [23] Gräfe, U. (1992) Biochemie der Antibiotika. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- [24] Griffith, J.M., A.J. Davis & B.R. Grant (1992) Target sites of fungicides to control oomycetes. *In* Target Sites of Fungicide Action (Hg. Köller, W.D.) CRC Press, Boca Raton: 69-100

- [25] Heideler, S., Radding & J. A. (1995) The *AUR1* gene in *Saccharomyces cerevisiae* encodes dominant resistance to the antifungal agent aureobasidin A (LY295337). *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**: 2765-2769
- [26] Hocking, A.D. (1993) Response of xerophilic fungi to changes in water activity. *In* Stress Tolerance of Fungi (Hg. Jennings, D.H.), *Serie Mycology Series* (Hg. Lemke, P.A.) Marcel Dekker, New York: 233-256
- [27] Hoeprich, P.D. (1992) Antifungal agents. *In* Encyclopedia of Microbiology (Hg. Lederberg, J.) Academic Press, San Diego: 107-122
- [28] Höfle, G., H. Steinmetz, K. Gerth & H. Reichenbach (1991) Ambruticin VS: New members of the antifungal ambruticin family from *Sorangium cellulosum*. *Liebigs Ann. Chem.* **1991**: 941-945
- [29] Hollomon, D.W. (1992) Target sites of hydroxypyrimidine fungicides. *In* Target Sites of Fungicide Action (Hg. Köller, W.D.) CRC Press, Boca Raton: 31-41
- [30] Holm-Hansen, O. & D.M. Karl (1978) Biomass and adenylate energy charge determination in microbial cell extracts and enviromental samples. *In* Bioluminescence and Chemiluminescence (Hg. DeLuca, M.A.), *Serie Methods in Enzymology* (Hrsg. Colowick, S.P. & N.O. Kaplan) Academic Press, New York: 73-85
- [31] Hutchcroft, J.E., M.J. Anostario, M.L. Harrison & R.L. Geahlen (1991) Renaturation and assy of protein kinases after electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *In* Protein Phosphorylation, Part A (Hrsg. Hunter, T. & M.S. Bartholomew), *Serie Methods in Enzymology* (Hrsg. Abelson, J.N. & M.I. Simon) Academic Press, New York: 417-423
- [32] Ishii, H. (1992) Target sites of tubulin-binding fungicides. *In* Target Sites of Fungicide Action (Hg. Köller, W.D.) CRC Press, Boca Raton: 43-52
- [33] Jennings, D.H.; Hg. (1984) Polyol metabolism in fungi. Academic Press, London
- [34] Judewicz, N.D., G.C. Glikin & H.N. Torres (1981) Protein kinase activities in *Neurospora crassa*. *Arch. Biochem. Biophys.* **206**: 87-92
- [35] Kaiser, C., S. Michaelis & A. Mitchell (1994) Methods in Yeast Genetic. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- [36] Kaiser, D. & C. Manoil (1979) Myxobacteria: Cell interactions, genetics, and development. *Ann. Rev. Microbiol.* **33**: 595-639

- [37] Kamada, Y., H. Qadota, C.P. Python, Y. Anrakus, Y. Ohya & D.E. Levin (1996) Activation of yeast protein kinase C by rho1 GTPase. *J. Biol. Chem.* **271**: 9193-9196
- [38] Kameshita, I. & Fujisawa (1989) A sensitive method for detection of calmodulin-dependent protein kinase II activity in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel. *Anal. Biochem.* **183**: 139-143
- [39] Kende, A.S., J.S. Mendoza & F. Yasuhiro (1993) Total synthesis of natural (+)-ambruticin. *Tetrahedron* **49**: 8015-8038
- [40] Kockova-Kratochvilova, A. (1990) Yeast and Yeast-like Organisms. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- [41] Köller, W.D. (1992) Antifungal agents with target sites in sterol function and biosynthesis. *In* Target Sites of Fungicide Action (Hg. Köller, W.D.) CRC Press, Boca Raton: 119-206
- [42] Köller, W.D. (1992) Target research in the discovery and development of antifungal inhibitors. *In* Target Sites of Fungicide Action (Hg. Köller, W.D.) CRC Press, Boca Raton: 255-310
- [43] Kruijff, B.d., W.J. Gerristen, A. Oerlemans, R.A. Demel & L.L.M.v. Deenen (1974) Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* **339**: 30-43
- [44] Kuo, S.-C. & S. Yamamoto (1975) Preparation and growth of yeast protoplasts. *In* Yeast Cells (Hg. Prescott, D.M.), *Serie Methods in Cell Biology*, Academic Press, New York: 169-184
- [45] Lancini, G. & F. Parenti (1982) Antibiotics, an Integrated View. (Hg. Starr, M.P.) Springer Verlag, New York
- [46] Latterich, M. & M.D. Watson (1993) Evidence for a dual osmoregulatory mechanism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **191**: 1111-1117
- [47] Lichtenberg, D. & Y. Barenholz (1988) Liposomes: Preparation, characterization, and preservation. *In* Methods of Biochemical Analysis (Hg. Glick, D.) John Wiley & Sons, New York: 337-462
- [48] Nevoigt, E. & U. Stahl (1997) Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**: 231-241

- [49] Norbeck, J. & A. Blomberg (1997) Metabolic and regulatory changes associated with growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 1.4 M NaCl. J. Biol. Chem. **272**: 5544-5554
- [50] Oh, C.-S., D.A. Toke, S. Mandala & C.E. Martin (1997) *ELO2* and *ELO3*, homologues of the *Saccharomyces cerevisiae ELO1* gene, function in fatty acid elongation and are required for sphingolipid formation. J. Biol. Chem. **272**: 17376-17384
- [51] Pillonel, C. & T. Meyer (1998) Biochemical mode of action of phenylpyrrols. 9<sup>th</sup> International Congress of Pesticide Chemistry, London,
- [52] Pridzun, L. (1992) Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Soraphen A. Doktorarbeit, TU Braunschweig, Braunschweig
- [53] Ratledge, C. & S.G. Wilkinson; Hrsg. (1988) Microbial Lipids. Academic Press, London
- [54] Reichenbach, H. (1981) Taxonomy of the gliding bacteria. Ann. Rev. Microbiol. **35**: 339-364
- [55] Reichenbach, H. (1999) GBF Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Abt. Naturstoffbiologie (pers. Mitteilung)
- [56] Reichenbach, H. & G. Höfle (1993) Production of bioactive secondary metabolites. In Myxobacteria II (Hrsg. Dworkin, M. & D. Kaiser) American Society for Microbiology, Washington: 347-397
- [57] Reynolds, T.B. (1998) The high osmolarity glycerol response (HOG) MAP kinase pathway controls localization of a yeast golgi glycosyltransferase. J. Cell Biol. **143**: 935-946
- [58] Ringel, S.M. (1978) In vitro and in vivo studies of ambruticin (W7783): New class of antifungal antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother. **13**: 762-769
- [59] Ringel, S.M. (1987) Ambruticin: A unique oral antibiotic. In Recent Trends in the Discovery, Development and Evaluation of Antifungal Agents (Hg. Fromtling, R.A.) J.R. Prous Publishers, Barcelona: 585-593
- [60] Ringel, S.M., R.C. Greenough, S. Roemer, D. Connor, A.L. Gutt, B. Blair, K. G. & M.v. Strandtmann (1977) Ambruticin (W7783), a new antifungal antibiotic. J. Antibiot. **30**: 371-375
- [61] Sato, N. & N. Murata (1988) Membrane lipids. In Cyanobacteria (Hrsg. Packer, L. & A.N. Glazer), Serie Methods in Enzymology (Hrsg. Abelson, J.N. & M.J. Simon) Academic Press, San Diego: 251-259

- [62] Schlüter, T. (1994) Untersuchungen zur Wirkungsweise von Ambruticin VS-3. Diplomarbeit, TU Braunschweig, Braunschweig
- [63] Schomburg, D. & D. Stephan (1995) Glyceroldehydrogenase E.C. 1.1.1.6. *In* Enzyme Handbook, Springer Verlag, Berlin: 1-5
- [64] Simpkin, K.G. (1985) Inhibition of growth and uptake of amino acids in the yeast, *Candida parapsilosis*, by ambruticin. *Sabouraudia: J. Med. Vet. Mycol.* **23**: 425-432
- [65] Tkacz, J.S. (1992) Glucan biosynthesis in fungi and its inhibition. *In* Emerging Targets in Antibacterial and Antifungal Chemotherapy (Hrsg. Sutcliffe, J.A. & N.H. Georgopapadakou) Chapman and Hall, New York: 495-523
- [66] Tunblad-Johansson, I. & L. Adler (1987) Effects of sodium chloride concentration on phospholipid fatty acid composition of yeasts differing in osmotolerance. *FEMS Microbiol. Lett.* **43**: 275-278
- [67] Varela, J.C.S. & W.H. Mager (1996) Response of *Saccharomyces cerevisiae* to changes in external osmolarity. *Microbiology <Reading>* **142**: 721-731
- [68] Watanabe, Y. & M. Takakuwa (1987) Change of lipid composition of *Zygosaccharomyces rouxii* after transfer to high sodium chloride culture medium. *J. Ferment. Technol.* **65**: 365-369
- [69] Wickerham, L.J. (1971) Hansenula H. et P. Sydow. *In* The Yeasts (Hg. Lodder, J.) North-Holland Publishing Company, Amsterdam: 226-315
- [70] Wuthier, R.E. (1976) SG-81 paper chromatography. *In* Lipid Chromatographic Analysis (Hg. Marinetti, G.V.) Marcel Dekker, New York: 70-73
- [71] Zyl, P.J.v., B.A. Prior & S.G. Kilian (1991) Regulation of glycerol metabolism in *Zygosaccharomyces rouxii* in response to osmotic stress. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 369-374

Lebenslauf

Name: Peter Knauth  
Geburtsdatum: 7.3.1969  
Geburtsort: Kiel  
Eltern: Antje Maria Lita Knauth, geb. Celinszak  
Hans Diethard Knauth  
Familienstand: ledig

1975 – 1979: Theodor-Heuss Grundschule, Kiel  
1979 – 1981: Max-Planck Gymnasium, Kiel  
1981 – 1988: Otto-Hahn Gymnasium, Geesthacht  
31.5.1988: Abitur  
1988 – 1989: Wehrdienst bei der Marine  
1989 – 1994: Studium Diplom Chemie an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg  
23.6.1993: Vordiplom Chemie  
1990 – 1996: Studium Diplom Biologie an der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg  
24.9.1992: Vordiplom Biologie  
28.3.1996: Diplom Biologie  
Anfertigung der Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Höpner mit dem Thema: „Wasserchemische und biologische Beobachtungen eines 1993 wiederentstandenen Flachsees (Nonnensee/Rügen) während der Vegetationsperiode 1995“  
1996: Anstellung als wissenschaftliche Hilfskraft im Rahmen des GOAP-Projektes an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald bei Prof. Conrad  
1996 – 1999: Anstellung als wissenschaftliche Hilfskraft an der GBF bei Prof. Reichenbach und Anfertigung der vorliegenden Dissertation